蛋白质的凝胶电泳

实践方法

B. D. 哈密斯　D. 利克伍德 著

58.17421
406

蛋白质的凝胶电泳

实践方法

B. D. 哈密斯　D. 利克伍德 著
刘毓秀　程桂芳 译

中国科学院图书馆藏
植物研究所

科学出版社
1986

243340
中科院植物所图书馆
S0014803

内 容 简 介

本书为蛋白质凝胶电泳的现代理论和实践的专论。全书在详尽地论述聚丙烯酰胺凝胶电泳原理及实验技术的基础上，对等速电泳、聚焦电泳、免疫电泳及双向凝胶电泳等技术作了系统介绍，并介绍了如何应用电子计算机"选择"凝胶电泳最适工作条件的最新技术，附录中列举了蛋白质研究工作中常用的方法和同位素标记蛋白质所应用的各种试剂，便于读者查阅。

本书适于生物化学、免疫学、分子生物学等领域的科学工作者阅读，也可供大专院校基础医学、生物化学等专业师生参考。

B. D. Hames and D. Rickwood
GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS
A PRACTICAL APPROACH
IRL Press Limited, 1981

蛋白质的凝胶电泳
实践方法
B. D. 哈密斯 D. 利克伍德 著
刘毓秀 程桂芳 译
责任编辑 吴铁双
科学出版社 出版
北京朝阳门内大街137号
中国科学院印刷厂 印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
*
1986年 9月第一版 开本：787×1092 1/16
1986年 9月第一次印刷 印张：14 1/8
印数：0001—2,800 字数：313,000

统一书号：13031·3291
本社书号：4629·13—10

定价：3.35 元

前　　言

分离方法的发展对生物学系统的阐明起了重要作用。在常用的各种技术方法中，凝胶电泳是最重要的方法之一。本书及其姐妹篇《核酸的凝胶电泳》详述了分离大分子的凝胶电泳方法。书中着重强调现代使用的电泳技术的实践。为了防止过分重复，对某些章节,其中包括某些重要的实际课题,作了必要的修订。我们感谢有关的作者，特别是出版者在这项工作中所表现出的耐性和谅解，同时还感谢 Irene Hames 对全书所作的精心校对。

B. D. 哈密斯

D. 利克伍德

目　　录

前言 ································· i

重要说明 ································· ix

缩写 ································· x

第 1 章　聚丙烯酰胺凝胶电泳导论 ································· 1

引言 ································· 1

聚丙烯酰胺凝胶的性质 ································· 2

化学结构 ································· 2

聚合催化剂 ································· 3

有效孔径 ································· 3

实验方法 ································· 3

柱胶和板胶 ································· 4

解离或非解离缓冲系统 ································· 5

连续或不连续(多相)缓冲系统 ································· 5

pH 选择 ································· 8

聚合催化剂的选择 ································· 9

凝胶浓度的选择 ································· 9

分子量测定 ································· 11

仪器 ································· 14

成胶装置和贮液槽 ································· 14

电泳所需要的其它装置 ································· 16

聚丙烯酰胺凝胶的制备和电泳 ································· 18

试剂 ································· 18

贮备液 ································· 19

凝胶混合液的制备 ································· 20

柱胶的制备 ································· 21

板胶的制备 ································· 24

样品制备 ································· 26

加样和电泳 ································· 29

电泳后的凝胶分析 ································· 30

凝胶的取出 ································· 31

蛋白质的染色及定量 ································· 32

放射性蛋白质的检定 ································· 36

糖蛋白及磷蛋白的测定 ································· 43

应用免疫学方法检测蛋白质 ································· 44

酶的检测 ································· 44

分离蛋白质的回收 ································· 45

蛋白质区带的定位 …… 45
蛋白质的洗脱 …… 46
基本技术的改进 …… 47
寡肽的分子量分析 …… 47
特殊蛋白质的分离 …… 47
组蛋白 …… 48
浓度梯度凝胶 …… 52
大批量凝胶 …… 57
微型柱胶和微型板胶 …… 57
琼脂糖-丙烯酰胺混合凝胶 …… 59
均一性和同一性 …… 59
矫作物及故障 …… 62
综合性参考文献 …… 63
第 2 章 “定量”和制备性的聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 64
引言 …… 64
定量 PAGE 电泳仪概述 …… 64
凝胶的选择 …… 66
缓冲系统的选择 …… 67
不连续的和连续的区带电泳 …… 67
可供选择的不连续缓冲系统：Jovin 输出 …… 68
定量 PAGE方法 …… 70
策略 …… 70
最适 pH …… 71
堆积界限的选择 …… 77
对蛋白质稳定和分离最佳条件的选择 …… 77
最适孔径：Ferguson 曲线图 …… 79
同一性试验 …… 85
分子大小和电荷异构 …… 87
物理特性 …… 88
最适分离孔径 …… 92
制备性 PAGE …… 93
凝胶切片的提取 …… 94
连续区带洗脱 …… 96
第 3 章 等速凝胶电泳 …… 100
引言 …… 100
操作程序 …… 100
稳态堆积条件的最佳化 …… 100
堆积区内的分离试验 …… 101
凝胶切片提取法进行制备性等速电泳 …… 102
用连续区带洗脱法进行制备性等速电泳 …… 105
连续区带洗脱法进行制备性稳态堆积 …… 106

第 4 章　分析和制备性凝胶聚焦电泳 …… 107
应用凝胶聚焦电泳的时机 …… 107
仪器 …… 108
柱胶与水平板胶装置 …… 108
电压控制装置 …… 109
梯度监测装置 …… 110
凝胶 …… 111
聚丙烯酰胺凝胶 …… 111
Sephadex 凝胶 …… 112
琼脂糖凝胶 …… 112
pH 梯度的形成 …… 112
"Ampholine" 与缓冲液 …… 112
两性或非两性载体组分 …… 113
平坦的和陡峭的 pH 梯度 …… 114
pH 梯度的直线性 …… 114
高离子强度下电聚焦 …… 114
去污剂存在下的聚焦电泳 …… 116
阳极和阴极电解液的选择 …… 116
聚焦电泳的动力学 …… 117
pH 梯度 …… 117
蛋白质 …… 119
导电性 …… 119
分析性凝胶聚焦电泳程序 …… 120
制备性凝胶聚焦电泳 …… 126
仪器 …… 126
程序 …… 127
第 5 章　双向凝胶电泳 …… 129
导言 …… 129
仪器 …… 129
第一向凝胶 …… 130
第二向凝胶 …… 130
双向凝胶电泳的一般技术 …… 131
溶液和仪器 …… 131
样品的制备 …… 132
第一向凝胶的制备 …… 133
平衡第一向凝胶以便进行第二向分离 …… 133
第二向凝胶的制备 …… 134
多肽分布的分析 …… 134
双向凝胶电泳的比较分析 …… 136
根据等电点及分子量进行蛋白质双向分离 …… 136
第一向分离 …… 137

第二向分离 …… 138
基本技术的改进 …… 140
影响分离的因素 …… 142
膜蛋白分离的改进 …… 143
特殊类型蛋白质的分离…… 144
核糖体蛋白 …… 144
组蛋白 …… 146
核蛋白 …… 148
第 6 章　蛋白质部分水解后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳肽图 …… 151
导言…… 151
仪器…… 152
方法学…… 152
实验步骤 …… 152
基本技术的改进 …… 155
资料的解释…… 157
第 7 章　免疫电泳…… 158
引言…… 158
抗原和抗体的制备…… 159
抗原 …… 159
抗体的产生 …… 159
抗血清商品 …… 161
抗体活性分析 …… 161
IgG 抗体的纯化 …… 161
简易免疫电泳…… 162
仪器 …… 162
试剂 …… 163
方法 …… 164
放射免疫电泳…… 165
酶检测法…… 166
免疫电泳法的其它改进…… 167
对流电泳 …… 167
“火箭”免疫电泳 …… 167
双向免疫电泳(交叉免疫电泳) …… 167
故障…… 170
综合性参考文献…… 170
附录 I　多肽检测方法文献目录 …… 171
多肽检测的一般方法…… 171
染色法 …… 171
荧光染色法 …… 172
直接检测法 …… 172
以放射性同位素为基础的检测方法…… 173

特殊多肽的检测方法…… 174
糖蛋白 …… 174
磷蛋白 …… 174
核蛋白 …… 175
具有可以进行反应的巯基蛋白质 …… 175
含镉蛋白 …… 175
胶原(蛋白)及原胶原蛋白 …… 175
免疫方法…… 175
酶检测法…… 176
附录 II 同位素标记蛋白质用试剂…… 180
一览表…… 180
试剂…… 181
乙酸酐 (^{3}H 或 ^{14}C) …… 181
Bolton 和 Hunter 试剂 (^{125}I)…… 181
溴乙酸 (^{14}C)…… 182
氯乙酸 (^{14}C)…… 182
对-氯汞苯磺酸 (^{203}Hg) …… 182
对-氯汞苯甲酸 (^{203}Hg) …… 183
丹磺酰氯 (5-二甲胺-1-萘磺酰氯) (^{3}H 或 ^{14}C) …… 183
DFP (二异丙基氟磷酸) (^{3}H)…… 184
乙基亚胺乙酯 (^{14}C)…… 184
N-乙基马来酰亚胺 (^{14}C) …… 185
1-氟-2,4-二硝基苯 (^{3}H 或 ^{14}C) …… 185
甲醛 (^{14}C)…… 186
碘 (^{125}I)…… 186
碘乙酰胺 (^{14}C)…… 187
碘乙酸 (^{3}H或 ^{14}C) …… 187
乙磺酰乙酰亚胺 (^{14}C)…… 188
马来酸酐 (^{14}C)…… 188
甲基 3,5-二碘羟基苯亚胺 (^{125}I) …… 188
异硫氰酸苯酯 (^{14}C 或 ^{35}S) …… 189
氢硼化钾 (^{3}H) …… 190
氢硼化钠 (^{3}H) …… 190
琥珀酸酐 (^{14}C) …… 191
N-琥珀酰亚胺丙酸 (^{3}H) …… 191
附录 III 选择蛋白质标志物的分子量及等电点 …… 193
附录 IV 供应电泳专用附件的厂商 …… 195
参考文献…… 196

重 要 说 明

凝胶电泳对健康的危害

(i) 许多常应用于凝胶电泳的化学物质具有毒性，而另外一些试剂对健康的影响尚不了解。因此,重要的是使实验者了解他们在处理本书所提及的各种化学物质时,应采取防护措施。处理丙烯酰胺时尤须特别注意,因为这类物质具有强烈的神经毒性,但聚丙烯酰胺凝胶无毒(除非凝胶中含有未聚合的单体)。

(ii) 使用凝胶电泳仪时应当小心，因为缺乏电学安全装置的仪器是危险的。在使用非商品性的电泳仪时更应特别注意,因为它们可能未达到通常所需要的安全措施标准。建议所有仪器在使用前均应由熟练的电工检查。

缩　写

A	安培
ACES	N-2-乙酰氨基-2-氨乙基磺酸（N-2-acetamido-2-aminoethanesulphonic acid）
AEPD	2-氨基，2-乙基，1，3-丙二醇（2-amino，2-ethyl ，1，3-propanediol; — Ammediol）
AMP	2-氨基-2-甲基-丙醇（2-amino-2-methyl-propanol）
ANS	1-苯胺基-8-萘磺酸盐（1-anilino-8-naphthalene sulphonate）
BAC	N，N′-二丙烯酰胱胺（N,N′-bisacrylylcystamine）
BES	N，N-双(2-羟乙基)-2-氨乙基磺酸［N，N-bis（2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulphonic acid］
Bicine	N，N′-双(2-羟乙基)甘氨酸［N，N′-bis（2-hydroxyethyl）glycine］
Bisacrylamide	N,N′-亚甲基双丙烯酰胺（N，N′-methylene bisacrylamide）
Bistris	［双(2-羟乙基)-氨基］三(羟甲基)甲烷［bis（2-hydroxyethyl)-amino］ tris（hydroxymethyl）methane］
Bistrispropan	1,3-双［三(羟甲基)甲胺基］丙烷［1，3-bis［tris（hydroxymethyl）methylamino］ propane］
%C	交联剂的百分数(以总单体的百分数表示)
$\%C_{Bis}$	双丙烯酰胺交联剂的百分数
$\%C_{DATD}$	DATD 交联剂的百分数
CTAB	溴化十六烷基三甲基胺（cetyltriammonium bromide）
CZE	连续区带电泳(用连续缓冲系统进行的区带电泳)
DATD	N，N′-双丙烯基酒石酸二酰胺（N，N′-diallyltartardiamide）
D.C.	直流电
DMAPN	3-二甲氨基-丙腈（3-dimethylamino-propionitrile）
DMSO	二甲亚砜（dimethylsulphoxide）
EDTA	乙二胺基四乙酸盐
EF	电聚焦
EPPS	N-2-羟乙基哌嗪-N′-3-丙磺酸（N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-3-propanesulphonic acid）
g	克
Xg	离心力（X 为单位重力场）
GABA	γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid）
GACA	γ-氨基己酸（γ-aminocaproic acid）
HEPES	N-2-羟乙基哌嗪-N′-2-乙磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2-ethanesu-

lphonic acid)

I. D.	内径
ITP	等速电泳
K_R	排阻系数（Ferguson曲线的斜率）；分子大小的一种量度
mol/L	mol 浓度
M	泳动率
M_0	自由电泳泳动率（$cm^2/s/v$）
mA	毫安
MDPF	2-甲氧基-2，4-二苯基-3（2 H)-呋喃酮（2-methoxy-2，4-diphenyl-3(2 H)-furanone)
MES	2-(N-吗啉)乙磺酸 [2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid]
MOPS	3-(N-吗啉) 丙磺酸 [3-(N-morpholino) propanesulphonic acid]
MTT	甲基噻唑四唑(鎓) [methyl thiazolyl tetrazolium]
MW	分子量
MZE	多相区带电泳(以多相缓冲系统进行的区带电泳)
NBT	硝基蓝四唑(鎓) [nitroblue tetrazolium]
O. D.	外径
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCA	过氯酸（perchloric acid）
pI	等电点
pI'	表观等电点
PITC	异硫氰酸苯酯（phenylisothiocyanate）
pK	解离常数的负对数(半数解离时的 pH 值)
PMS	吩嗪甲硫酸盐（phenazine methosulphate）
PMSF	苯基甲基磺酰氟（phenylmethylsulphonyl fluoride）
POPOP	1,4-二[2-(5-苯基噁唑基)]苯 [1, 4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene
PPO	2,5-二苯噁唑（2, 5-diphenyloxazole）
$\bar{R}$	几何平均半径
R_f	相对电泳迁移率(即与染料前沿或与移动界面'前沿'有关)
SDS	十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulphate; sodium lauryl sulphate）
SDS-PAGE	SDS 存在下的聚丙烯酰胺凝胶电泳
SSS	稳态堆积（steady-state stacking）
%T	定义为聚丙烯酰胺凝胶中全部单体的百分浓度（即丙烯酰胺 + 交联剂，g/100ml）
T_{max}	两种蛋白质获得最大分离的凝胶浓度
T_{opt}	两种蛋白质之间获得最大分辨率时的凝胶浓度
TAPS	3-{[3(羟甲基)甲基]氨基}丙磺酸 [3-{[tris (hydroxymethyl) methyl] amino} propanesulphonic acid]
TCA	三氯醋酸

TEMED	N, N, N′, N′-四甲基乙二胺 (N, N, N′, N′-tetramethylethylenediamine)
TES	2-{[三 (羟甲基) 甲基] 氨基乙磺酸 (2-{[tris (hydroxymethyl) methyl] amino} ethanesulphonic acid]
Tricine	N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸 [N-[tris (hydroxymethyl) methyl] glycine]
U. V.	紫外线
V	伏特
V	分子价(净质子/分子) [molecular valence (net protons/molecular)]
W	瓦特
y_0	Ferguson 图上的 y 截距；分子净电荷数的一种量度

第1章　聚丙烯酰胺凝胶电泳导论

B. David Hames

引　　言

所有带电离子或基团在电场中都能泳动。除了在其等电点以外，蛋白质在任何 pH 下都带净电荷，因而也能泳动，其泳动速度取决于所研究的蛋白质的电荷密度(电荷与质量的比值)；电荷与质量的比值越大，分子泳动的速度越快。因此，给溶液中的蛋白质混合物施加电场将导致不同的蛋白质以不同速度朝向某一电极泳动。由于所有蛋白质最初分布于整个溶液中，故所获得的分离效果极低。区带电泳是这一方法的一种改进，它将待分离的蛋白质分子的混合物置于距电极适当距离的狭窄区域或区带上，以便在电泳时，迁移率各不相同的蛋白质以不连续的区带移动，从而使它们在电泳过程中逐步分离。理论上，若蛋白质的相对泳动率明显不同，且泳动的距离又足够大，则不同的蛋白质很容易通过形成不同的区带得到分离。然而，实际上自由溶液中的区带电泳存在着某些缺陷。首先，电泳引起的任何热效应能引起液柱的对流扰动并破坏正在分离的蛋白质区带。其次，扩散作用将不断地使蛋白质区带加宽，而且在电泳结束后，这一作用还在进行。为了减小这类效应，蛋白质区带电泳几乎不在自由溶液中进行，而是在具有起稳定作用的某种支持介质内的溶液中进行。除了能减少电泳时对流和扩散的有害作用外，使用支持介质使得研究者能在电泳后立即将分离的蛋白质固定在其最终的位置上，因而避免了由于电泳后的扩散作用所引起的分辨率的降低。所应用的固定方法随所选用的支持介质的不同而不同。

通常采用的支持介质有许多种，最通用的是滤纸条或醋酸纤维素薄膜，铺于玻璃或塑料板上形成一薄层的硅胶、氢氧化铝或纤维素等材料以及琼脂糖、淀粉或聚丙烯酰胺凝胶。这些介质分为两大类。纸、醋酸纤维素和薄层物质是相对惰性的材料，主要起支持作用并减少对流。因而以这类材料进行的蛋白质的分离主要取决于所选定的 pH 条件下蛋白质的电荷密度，如同在自由溶液中进行的电泳一样。与此相反，各种凝胶不仅阻止了对流和降低了扩散作用，而且在某些场合下，它们通过与泳动中的粒子相互作用，也积极地参与分离过程。这类凝胶可以认为是具有孔径与蛋白质分子大小大致相同的有孔介质，因而能产生分子筛效应，其分离作用既与电荷密度有关，又与分子大小有关。例如，用纸电泳不能将两种分子大小各异但电荷密度相同的蛋白质分离开来；然而若分子大小相差悬殊，用聚丙烯酰胺凝胶电泳，由于分子筛效应使分子量较大的蛋白质比分子量较小的蛋白质分子泳动慢，结果可以将它们分离开来。

分子筛效应的大小取决于凝胶孔径大小与泳动粒子大小相接近的程度。由于琼脂糖凝胶孔径相当大，对大多数蛋白质分子而言，其分子筛效应微不足道，因而分离作用主要决定于电荷密度。相反，淀粉及聚丙烯酰胺凝胶的孔径与蛋白质分子大小相近，因而这类凝胶的确具有分子筛作用。但是，淀粉凝胶电泳的成功与否极大程度取决于淀粉凝胶本

身的性质。从生物材料中制备的淀粉凝胶其重现性不佳，还可能含有对结果产生不良影响的杂质。另一方面，在标准化的聚合状态下，由丙烯酰胺单体聚合而成的聚丙烯酰胺凝胶，常常能以可重复的方式用高纯度的试剂制备。可以从市面上以合理的价格购得聚合反应中所需的高纯度制剂，尽管出于某种目的，有时需将它进一步纯化。此外，聚丙烯酰胺凝胶具有化学性质不活泼，在范围较大的 pH、温度和离子强度的条件下稳定，以及透明等优点。最后，聚丙烯酰胺容易制备成孔径范围很宽的凝胶以适应不同大小蛋白质分子的分级分离，而用淀粉凝胶所获得的孔径范围十分有限。基于上述及其它原因，虽然淀粉凝胶已广泛用于同工酶的分析，但聚丙烯酰胺凝胶已成为大多数蛋白质进行区带电泳所选用的介质。Gordon[1] 和 Smith[2] 对淀粉凝胶电泳已进行评述。琼脂糖凝胶所分级分离的分子或复合物比聚丙烯酰胺凝胶大，特别适合于分离某些核酸和核蛋白。此外，琼脂糖还广泛应用于将蛋白质区带电泳与免疫检定和免疫定量相结合的免疫电泳中（见第 7 章）。

聚丙烯酰胺凝胶的性质

化学结构

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体聚合成长链，并且通过双功能化合物如 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺（通常缩写为双丙烯酰胺）与长链末端游离的功能基反应交联而成。出于

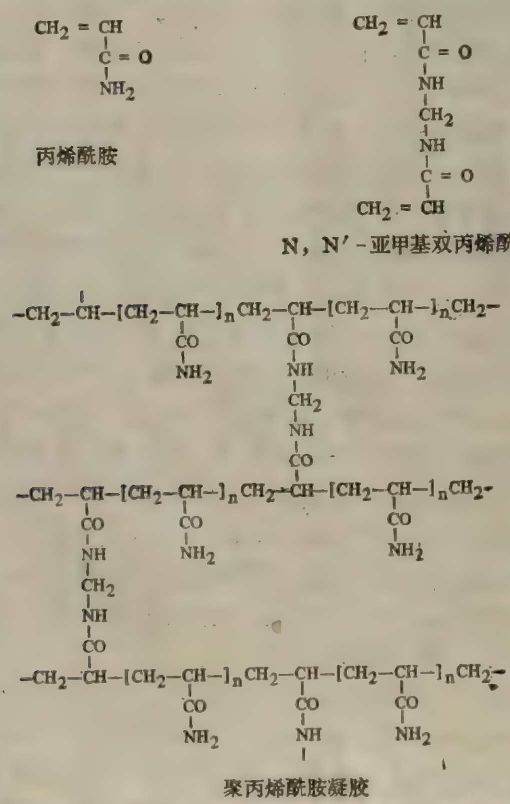


图 1　丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺及聚丙烯酰胺凝胶的化学结构。

某些特殊目的，也采用其它交联剂以赋予凝胶特殊的溶解性质。单体及交联以后凝胶的最终结构见图1。

聚合催化剂

丙烯酰胺的聚合是通过加入过硫酸铵或核黄素来起动的。此外，也可以加入 N，N，N′，N′-四甲基乙二胺（TEMED）或 3-二甲胺-丙腈（DMAPN）（3-dimethylamino- propionitrile）（不常用）作为聚合过程的促进剂。

在过硫酸胺-TEMED 系统中，TEMED 催化过硫酸盐形成自由基，而形成的自由基反过来又起动聚合反应。由于反应需要 TEMED 的游离碱基，所以在 pH 偏低的条件下，聚合反应可能延迟甚至被阻止。增加 TEMED 或过硫酸铵浓度可以增加聚合反应速率。

与用过硫酸盐催化的化学聚合反应不同，使用核黄素-TEMED 的系统需要光来起动聚合反应。光照引起核黄素光分解并生成必需的自由基。虽然照射仅含丙烯酰胺和核黄素的溶液也能生成凝胶，但常需加入 TEMED，使聚合反应更好地进行。

氧抑制聚合反应，因此凝胶混合物在使用前常需要脱气。

有效孔径

聚合反应混合物中，丙烯酰胺的总浓度对聚丙烯酰胺凝胶的有效孔径有很大的影响。丙烯酰胺浓度增加，有效孔径减小。丙烯酰胺浓度低于 2.5% 左右，对分子量大于 10^6 的分子具有分子筛作用的凝胶几乎为液体，但可以加入 0.5%的琼脂糖来弥补。在另一种极端的例子中，对分子量低至 2,000 的多肽有明显分子筛作用的凝胶，其丙烯酰胺浓度高达30%以上。正如人们所预计的那样，选择丙烯酰胺浓度是利用区带电泳对蛋白质组分作最佳分离的关键，下文将就此进行更详尽的探讨。

对于任何单体浓度已确定的聚丙烯酰胺凝胶，其有效孔径、硬度、脆性、光散射性及膨胀性质随所使用的交联剂的比例变化而变化。在无交联剂存在下的聚合将导致散乱的聚合链的形成，结果产生粘稠的溶液。若在聚合的混合液中加入双丙烯酰胺，由于散乱的聚合链之间交联形成共价网络而产生凝胶。随着交链剂比例增加，凝胶孔径减小，当双丙烯酰胺达单体总浓度的 5%（即 $C_{Bis}=5\%$）时，孔径最小。随着双丙烯酰胺比例增加，聚合链交联成越来越大的囊，囊与囊之间具有大的空间，结果有效孔径再次增加。孔径依赖于交联剂的比例而与所使用的单体总浓度无关，因此若双丙烯酰胺的比例大于或小于 5%的最佳值，单体总浓度较大的凝胶比总浓度较低的凝胶有更大的有效孔径。

实 验 方 法

在研究者仔细斟酌聚丙烯酰胺凝胶区带电泳的详细方法学之前，就分离工作的总策略加以考虑是有价值的。实际上，研究者必须决定凝胶应当采用的最适的物理形式（柱胶或板胶），是使用解离缓冲液还是非解离缓冲液（以及是否应当应用连续的或非连续的系统），分离时应采用的 pH 和缓冲剂的离子强度，最后，还应决定哪种凝胶浓度对所分离的蛋白质最适合。一旦研究者对欲获取的资料和利用电泳法获得的某些资料加以考虑分

析，上述问题中的一部分可立即得到解答。其它问题可能需要预实验才能获得满意的解答。

柱胶和板胶

最初的分析性区带电泳使用装在玻璃管中的聚丙烯酰胺柱状胶条，而目前常使用厚0.75—1.5mm 的板胶。板胶最重要的优点之一是包括标志分子量的蛋白质在内的许多样品，能在同一板胶中在相同的条件下电泳，因此便于直接比较产生的区带图(图 2)。相反，由于聚合效率、凝胶长度和直径等的细微差别，即使是同一样品在柱胶上电泳，其结果也

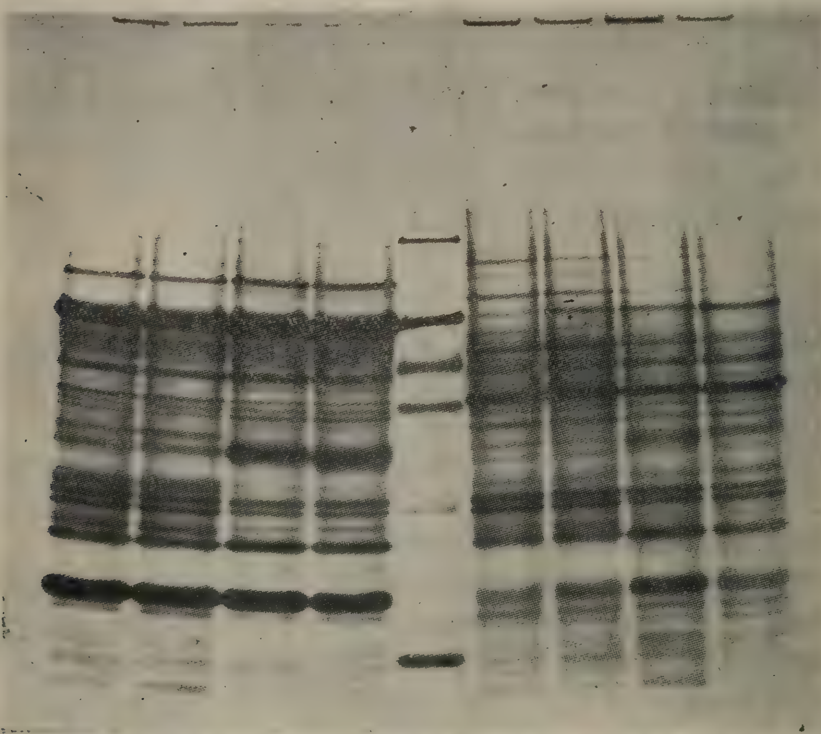


图 2 用板胶对多肽样品组分进行 SDS-PAGE 分析的典型图谱。用 SDS-不连续缓冲系统，在 10—15% 线性梯度凝胶中，室温下将从大鼠附睾不同区域管腔中获得的可溶性蛋白质电泳 5 小时，电流为 20 mA。图中央部位的区带为下列分子量标志多肽：β 半乳糖苷酶，牛血清白蛋白，γ 球蛋白重链，卵清蛋白，γ 球蛋白轻链和细胞色素 c。电泳后用考马斯蓝 R 250 (coomassie blue R 250) 染色显示多肽（承 D. Brooks 博士允许拍照）。

极少相同。板胶的其它优点如下：

(i) 与常用的较厚的柱胶相比较，标准板胶电泳时产生的热更容易消散，因而使热效应所引起的蛋白质区带变形减少；

(ii) 板胶的矩形截面可使光密度测定和照象时产生光学假象的可能性减小，并且便于干燥贮存或放射性自显影；

(iii) 在相同条件下，制备供多个样品电泳用的凝胶所需时间较短。在一块标准板胶上，能顺利地容纳下多至 25 个样品。

鉴于上述多种优点，人们可能提出进行分析性分离工作时是否还需要使用柱胶的问

题。有几种情况需要继续使用柱胶。首先,电泳后研究者希望将凝胶切成胶块,并测定每一胶块中的放射性(对放射性标记的蛋白质),或洗脱并测定蛋白质的生物活性以分析有关的蛋白质。虽然柱胶和板胶都能切片,但就通常使用的凝胶大小而言,前者样品容量较大,更适用于这一目的。另外,若研究者希望使用自动切胶装置,他可能选择柱胶,因为这类装置的大多数是为柱胶设计的。其次,若欲确定蛋白质组分分离时的最适 pH 或凝胶浓度,柱胶常常是优先选取的形式,这是因为用柱胶试验许多条件只需付出很少的努力,特别是在采用为这一目的加以改装的柱胶电泳仪时更是如此(见第 2 章)。最后,由于双向电泳技术的建立,柱胶的应用日益增加,在双向电泳技术中,蛋白质混合物首先在柱胶上作第一向分离,然后将柱胶粘附在一块板胶的边缘,进行蛋白质组分的第二向电泳分离。这一高分辨率的方法将在第 5 章详述。

解离或非解离缓冲系统

在蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶区带电泳中,大多数研究工作系采用能将所有蛋白质解离为多肽亚基的缓冲系统。最常用的解离剂是离子型去污剂、SDS。在过量 SDS 和巯基试剂(以裂解二硫键)存在下,将蛋白质混合物加热至 100℃ 变性。在这种条件下,大部分多肽以恒定的重量比与 SDS 结合 (1 g 多肽结合 1.4 g SDS)。与结合的去污剂所提供的负电荷比较,多肽固有的电荷无重要意义,因此 SDS-多肽复合物基本上具有相同的电荷密度,在适当孔率的聚丙烯酰胺凝胶中,严格按照多肽分子的大小泳动[3,4]。于是,除了分析样品中的多肽组成外,通过参照在相同电泳条件下已知分子量多肽的迁移率,研究者可以测定多肽样品的分子量。本方法简便、快速,并且只需要微克数量级的蛋白质样品,从而使 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 成为测定蛋白质样品组成的复杂性及其分子量的应用极为广泛的一种方法。鉴于各种来源的蛋白质几乎都能迅速地被 SDS 溶解,因此这一方法可以普遍应用。

尿素也被用作解离剂,它是通过破坏氢键而起作用的。作用时需要使用高浓度(~8 mol/L)。欲使含二硫键的蛋白质完全变性还需要加入巯基试剂,电泳时必须有尿素存在以维持变性状态。在某些实例中尿素的优点是不影响蛋白质的固有电荷,因此与应用 SDS 的电泳分离不同。尿素作为解离剂进行的多肽组分分离是基于分子的大小及分子所带电荷。缺点是由于分离作用受分子大小和电荷多少双重因素的影响,因而不能精确地测定分子量。而且,在解离蛋白质方面,尿素不如 SDS 优越;高达 50% 的复杂蛋白质混合物不能进入凝胶,而以 SDS 作解离剂,即便是天然细胞的胞溶物,至少有 90% 可以进入凝胶。然而,欲使这类物质的大多数进入凝胶,则某些蛋白质的入胶不仅需要尿素,同时还需要 SDS。

与上述系统不同,在非解离缓冲系统中,用区带电泳来分离天然蛋白质,目的是为了保存亚基之间的相互作用、天然蛋白质的构象及其生物活性。天然蛋白质是根据分子大小和电荷来分离的。有关各种已应用的非解离缓冲系统的详尽内容,将在本章的下节及随后的叙述中予以介绍。

连续或不连续(多相)缓冲系统

连续缓冲系统是整个样品、凝胶及电极槽缓冲液中的缓冲离子相同(尽管二只槽中的

离子浓度可能不同)且 pH 值恒定的区带电泳系统。在这种系统中，蛋白质样品直接加于凝胶上进行分离，分离胶的小孔相当小（图 3 a, b)，电泳时足以使样品组分按分子大小分级分离。相反，不连续(或多相)缓冲系统的凝胶与电极槽应用的缓冲离子不同。多数不连续缓冲系统的缓冲剂和 pH 均不连续。在这些系统中，样品加在孔径大的浓缩胶上，而浓缩胶则聚合在小孔径的分离胶之上(图 3 c, d)。

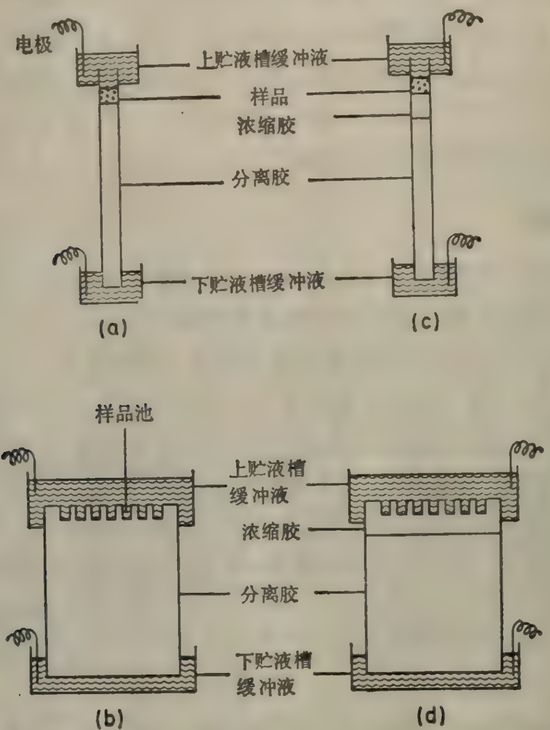


图 3　连续及不连续缓冲系统的柱状和板状凝胶。(a) 与柱胶有关的连续缓冲系统；样品直接加于分离胶上。(b) 与板胶有关的连续缓冲系统；样品直接加于由分离胶形成的小池内。(c) 和 (d) 分别为与柱胶和板胶有关的不连续系统，样品直接加到浓缩胶上，或者加在浓缩胶形成的小池中。

与连续缓冲系统比较，不连续缓冲系统的主要优点是凝胶上可加体积相当大的蛋白质稀溶液，仍然可以使样品的各组分得到良好的分离。究其原因是在电泳过程中，蛋白质样品在小孔径的分离胶中分离之前，先经过大孔径浓缩胶的迁移作用而被浓缩至一极狭窄的区带（堆积区)。不连续系统之所以产生极窄的蛋白质起始区带，可以通过考查 Ornstein[5] 和 Davis[6] 早期的不连续系统实例来理解。

让我们来考虑一种弱酸，例如甘氨酸，在接近其 pK_a 的 pH 值时，任一时刻都只有一部分分子带负电荷。若 x 是全部分子中被解离的并以负离子的形式存在的部分，则每一分子可以看作是在全部时刻中的 x 时刻带电，其余时刻则不带电。因此，若带电分子的泳动率为 M，则有效泳动率 $= Mx$，泳动速度 $= V \cdot Mx$（此处 V 为电压梯度)。若电压和有效泳动率的乘积相等，泳动率较低的离子其泳动速度可以和泳动率较高的离子一样快。在 Ornstein-Davis 系统中，样品本身及浓缩胶均含有 Tris-HCl 缓冲液，而上贮液槽盛有 Tris-甘氨酸缓冲液(图 4 a)。在样品和浓缩胶的 pH 中（pH 6.7)，甘氨酸很少解离，因此泳动率很低。在这一 pH 条件下，氯离子具有很高的泳动率，蛋白质的泳动率则介乎氯离

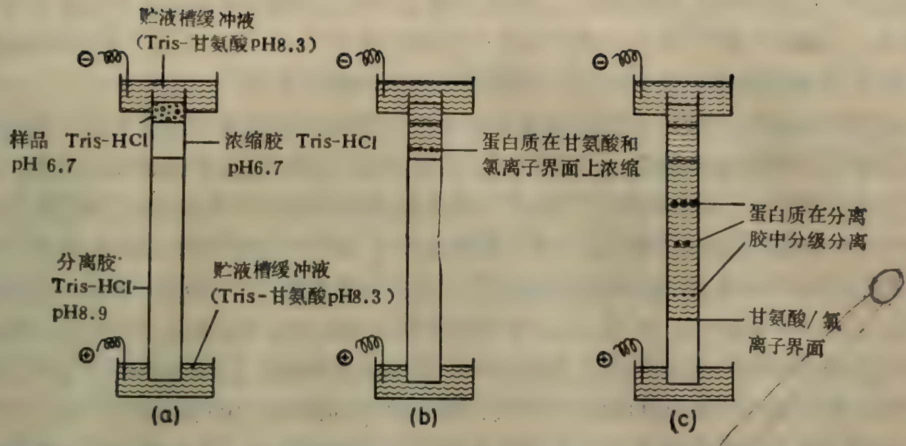


图 4 Ornstein-Davis 不连续缓冲系统的操作。(a) 电泳开始时，(b) 在浓缩的过程中，(c) 在分离胶中分离时。详细说明见正文。

子和甘氨酸之间。一旦施加电压，氯离子(先导离子，leading ions)与甘氨酸(后随离子，trailing ions)泳离，并在其后部留下一条导电性较低的区带。由于导电性与电场强度成反比，因此这一区带获得较高的电压梯度，并加速甘氨酸的泳动，使其赶上氯离子。于是建立起甘氨酸和氯离子的电压梯度和泳动率乘积相等的稳定态，使这些带电颗粒以相同速度泳动，两种离子之间具有明显的边界面。当甘氨酸/氯离子界面通过样品然后进入浓缩胶时，在移动的界面前有一低电压梯度，在界面后有一个高电压梯度。由于在移动界面前的任何蛋白质泳动速度比氯离子低，因此氯离子能迅速越过。移动界面后部的蛋白质处于较高的电压梯度中，其泳动速度比甘氨酸快。因此，移动的界面将蛋白质推移至一起，浓缩成为极薄的区带或层带，一条带叠加在另一条带上，以便降低迁移率，甘氨酸则紧跟在蛋白质之后(图 4 b)。蛋白质在移动界面中的浓缩作用仅取决于样品和浓缩胶中的 Tris-HCl 的浓度，而与样品中蛋白质的最初浓度无关。稳定态蛋白质层的厚度与样品中蛋白质的最初浓度无关，仅仅取决于加至凝胶上的蛋白质总量。在典型的分析性聚丙烯酰胺凝胶电泳中加入蛋白质，所形成的蛋白质层厚度仅仅几微米。由于浓缩胶为大孔径胶，这时不发生分子筛作用。

当移动界面到达浓缩胶和分离胶的分界面时，凝胶的 pH 值明显增加，并导致甘氨酸大量解离。因此，甘氨酸有效泳动率增加，结果甘氨酸越过蛋白质并直接在氯离子后移动。同时，凝胶孔径明显降低，由于分子筛作用使蛋白质迁移率减小。这两种作用不能使蛋白质浓缩。于是蛋白质在一均一的电压梯度和 pH 值的区带中泳动(此时 Tris-甘氨酸 pH 为 9.5，而不是最初的分离胶缓冲液 Tris-HCl pH 8.9)，并根据其固有的带电性及分子大小进行分离，后者与小孔径分离胶的分子筛效应有关(图 4 c)。

由于用不连续缓冲系统可以获得高分辨率，所以通常选用将 SDS 加于各缓冲剂中的 SDS-不连续缓冲系统，以便在解离条件下使蛋白质混合物获得高分辨率的分级分离。最常用的 SDS-不连续系统最初由 Laemmli[7] 述及，系在 Ornstein-Davis 不连续缓冲系统中加入 SDS 构成。的确，板胶目前几乎完全采用 Laemmli 的 SDS-不连续系统。Neville[8] 提出了另一种由 Tris-硼酸缓冲剂组成的 SDS-不连续系统。柱胶常用 Laemmli SDS-不连续系统或通常为含有 SDS 的磷酸钠缓冲液的连续缓冲系统。SDS-磷酸缓冲系统的优

点是简便，与 Laemmli 系统相比较，对某些商品 SDS 中的杂质所引起的假象不敏感。尽管如此，Laemmli SDS-不连续缓冲系统优良的分辨能力，表明它无疑仍然是分离蛋白质，特别是在分离复杂蛋白质混合物时主要应用的解离缓冲系统。

遗憾的是至今尚缺乏理想的用于电泳分离天然蛋白质的通用缓冲系统。缓冲系统的选择必须既能保持待分离蛋白质的活性，又能使蛋白质的组分得到足够的分离，以满足研究工作的需要。直到最近，仅发现三种不连续缓冲系统可用来分离天然蛋白质，即 Ornstein-Davis 的高 pH 系统(见上文)，系在 25℃，pH 9.5 的条件下分离蛋白质；“中性” pH 系统，在 pH 8.0 的条件下分离蛋白质[9]；及低 pH 系统，在 pH 3.6 的条件下分离蛋白质[10]。下文将予以详述。但是，基于缓冲剂组分的 p*K* 和离子泳动的资料以及不连续（多相)区带电泳的理论，目前已设计出数千种不连续缓冲系统，它们可应用于 pH 2.5—11.0 的范围，并可用于计算机的输出。有关计算机输出的说明及应用参见第 2 章。

某些天然蛋白质在到达不连续缓冲系统极薄的浓缩区时，由于蛋白质浓度极高可发生凝聚并产生沉淀，不能进入分离胶或形成“条纹”(Streaking)。当凝聚的蛋白质积聚在凝胶表面，随后在电泳过程缓慢溶解时即产生这一现象，所产生的蛋白质条纹的运动方向与电泳泳动方向一致，采用连续缓冲系统常常可以克服这一困难，因为它避免了样品浓缩到产生沉淀的程度。幸运的是，若某些条件得到满足，应用连续缓冲系统仍然可以得到良好的分离效果。首先，加入的样品体积必须尽可能小，以产生窄的起始区带。与测定电泳后分离的蛋白质带所应用的方法有关，样品蛋白质的浓度一般要求约为 1 mg/ml 浓缩的溶液。当蛋白质进入分离胶后，其泳动率显著低于处于自由溶液中的蛋白质，即出现更清晰的区带。其次，蛋白质样品若溶于较凝胶或电极缓冲液离子强度更低(例如 $\frac{1}{5}$—$\frac{1}{10}$)的缓冲液中，区带可进一步变窄。蛋白质最初处于离子强度较低(导电性较低)的区带中，因而处于较高电压梯度内，因此其移动速度仍较在自由溶液中的移动速度快。蛋白质进入凝胶后，由于凝胶所产生的分子筛效应及蛋白质进入较浓的凝胶缓冲液所致的电压梯度降低，蛋白质泳动速度减慢。实际上，各种缓冲液都能以连续缓冲系统的形式来电泳分离天然蛋白质。对大多数蛋白质而言，问题是需要通过实验去决定哪种缓冲液最合适。下文将列举某些常用的非解离性缓冲液。但是，某些蛋白质例如组蛋白、核非组蛋白、核糖体蛋白以及膜蛋白在常用的非解离缓冲液中不溶解，因此根据它们的电荷及分子大小进行分析时需加入某些试剂，如尿素、水合氯醛或非离子型去污剂。这些试剂将在后文进行讨论。

pH 选择

聚丙烯酰胺凝胶电泳可以在 pH 为 2.5 至 11 之间的各种 pH 值中进行，但实际上在过酸或过碱的条件下将发生某种水解反应（如脱酰胺作用)，所以 pH 应限制在 3—10 之间。

在 SDS-PAGE 中，SDS-多肽复合物在相当大的 pH 范围内带负电荷，因此 SDS-磷酸盐连续缓冲系统的 pH 值无关紧要。只有在使蛋白质样品通过浓缩现象进行浓缩的这类分离工作中，SDS-不连续缓冲系统的 pH 值才具有重要意义。与此相反，在以天然蛋白质的分子大小和电荷密度为基础进行分离的非解离缓冲系统中，聚丙烯酰胺凝胶电泳

的 pH 值显得极为重要。 在这类工作中，改变 pH 值可以改变蛋白质组分的净电荷并使它们得以分离。

选择用来分离天然蛋白质的连续缓冲系统的 pH 时，首先必须考虑所研究的蛋白质在此 pH 范围内稳定。与检定全部天然蛋白质以不解离为其组成亚基的标准蛋白染色法相比较，若人们希望蛋白质保存其生物活性(无论是出于检定目的还是用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行大规模制备)，其 pH 范围可能更窄。 在这种 pH 范围内，pH 的选择是两种对立因素的折衷。电泳缓冲液 pH 距待分离蛋白质的等电点越远，蛋白质具有的电荷就越多，电泳分离只需较短的时间，从而减少了由于扩散作用所致的区带扩展。另一方面，pH 越接近蛋白质等电点，蛋白质之间的电荷差别也越大，于是增加了分离的可能性。许多蛋白质的等电点在 pH 4—7 范围内，因此通常采用 pH 为 8.0—9.5 范围的缓冲系统。理论上应该进行系统研究，即将 pH 值逐渐调节至蛋白质等电点，直至找出对蛋白质混合物产生最佳分离效果的 pH 值。对于需要在酸性 pH 环境下进行分离的碱性蛋白，也能进行类似的研究。

聚合催化剂的选择

虽然过硫酸铵是制备分离胶常用的起动剂，但在大多数情况下，选择过硫酸铵-TEMED 或核黄素- TEMED 系统是根据个人喜好。不连续缓冲系统的浓缩胶常常用过硫酸铵或核黄素聚合。若被分离的天然蛋白质对过硫酸盐离子特别敏感，而在连续缓冲系统中聚合分离胶时又应用了过硫酸铵，那么在加蛋白质样品之前将凝胶预先电泳一段时间可将过量的过硫酸盐离子除去。(但这一步骤在不连续缓冲系统中不可能进行，因此在这类系统中，至少在聚合大孔径浓缩胶时应当应用核黄素。)

采用核黄素作催化剂的其它优点是光照凝胶混合物后才能发生聚合作用。这一特点有助于腾出部分时间，以便在混合物上铺一层缓冲液，或在板胶电泳中调节样品梳，或制备多块(支)凝胶板(管)。若分离胶用核黄素作催化剂，由于光照影响凝胶的孔率，因而影响蛋白质的迁移率，所以光照时间应当标准化。

凝胶浓度的选择

聚丙烯酰胺凝胶区带电泳中蛋白质区带的分离，与区带之间的距离有关，而与区带的宽度无关；分辨率则指与区带宽度有关的区带间隔。两种组分间的分辨率受各种影响区带清晰程度因素的影响。例如为防止过度负载，采用少量蛋白质样品、应用不连续缓冲系统稀的蛋白质样品以及从样品中除去高浓度的盐，均能极大地提高分辨率。影响分离的主要因素是凝胶的 pH (指天然蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳，而不是 SDS-PAGE) 及凝胶浓度。极端条件下，选用不适当的凝胶浓度可能导致蛋白质不能进入胶中，而全部被排阻在胶外，或者反过来，蛋白质随缓冲液向前推移而不能进行分级分离。在这两种极端情况之间，蛋白质将依据凝胶的浓度获得不同程度的分离。虽然对任何两种蛋白质的分离存在着某一适宜的凝胶浓度(见下文)，但并不存在能使复杂的蛋白质混合物中各组分相互之间获得最佳分离的凝胶浓度。因此，异质混合物分级分离选用的凝胶浓度通常是对有关的所有组分都能显示出良好分离作用的浓度。用非解离缓冲系统对蛋白质开始进行分析的合理方法应当是首先选用 7.5% 丙烯酰胺凝胶，然后再尝试使用浓度为 5—15%

的一系列凝胶，并选择最有希望的浓度作进一步研究。对于 SDS-PAGE，除非多肽混合物的分子量范围已知，一般可以从现有的多肽分子量与泳动率校正曲线上选取合适的凝胶浓度（图 6），此外也可以尝试应用类似的办法。推荐的另一种用 SDS-PAGE 对蛋白质混合物作初步分析的方法是应用浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶，在这种浓度梯度凝胶中，丙烯酰胺的浓度沿蛋白质的迁移方向逐渐增加，所以凝胶的孔径逐渐减小。在进行复杂蛋白质混合物的分析时，梯度凝胶与均一浓度的凝胶相比有两个明显的优点。首先，前者分级分离蛋白质分子量的范围比任何均一浓度凝胶分离的范围广泛得多。其次，泳动时孔径梯度使得蛋白质区带在移动时区分明显。其结果是梯度凝胶在分离分子量范围广，且要求所有组分在同一凝胶上显现的蛋白质混合物时，是无与伦比的。一种用于 SDS-PAGE 初步分析工作的有效梯度凝胶是 5—20% 或 6—18% 线性梯度板凝胶。有关梯度凝胶的制备和应用的详尽说明可参见下文。

若聚丙烯酰胺凝胶电泳的目的是使两种蛋白质的分离得到最佳的分辨率，而不是单纯显示出所研究的蛋白质的组分，那么仅用单一的最适丙烯酰胺浓度即可满足需要。所需要的凝胶浓度取决于所研究的蛋白质的分子大小和电荷量，并且可以通过测定每种蛋白质在一系列浓度不同的丙烯酰胺凝胶中的泳动率，然后作出每一有关蛋白质的 Ferguson 图[11]，即用相对泳动率 R_f 以 10 为底的对数（$\log_{10}$ 相对泳动率 R_f）与凝胶浓度，%T（每 100 ml 凝胶中所含丙烯酰胺与双丙烯酰胺的总克数）作图来决定。相对泳动率 R_f 定义为以标志蛋白质或示踪染料为参比物所量度的有关蛋白质的泳动率，即：

$$R_f = \frac{\text{蛋白质泳动距离}}{\text{染料泳动距离}}$$

每一 Ferguson 图以其斜率 K_R 及纵轴截距 Y_0 为特征。由于只是在凝胶孔径（由 %T 决定）改变时，Ferguson 图才与电泳时的泳动率有关，因此 Ferguson 图的斜率 K_R 可以量度凝胶对蛋白质的阻滞作用，即 K_R 是与分子大小有关的阻滞系数。纵轴截距 Y_0（此时 % T = 0）可以量度蛋白质在自由溶液中的泳动率。Rodbard 等[12]着重应用这一分析法将分离中的问题归纳为四类（图 5）。

A: 蛋白质在自由溶液中具有相同电荷密度，并显示有相同的泳动率。在聚丙烯酰胺凝胶中，这些蛋白质严格按照分子大小移动。绝大多数 SDS-变性蛋白质大体属于这种情况。

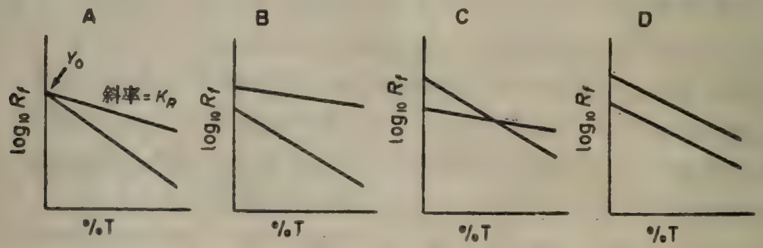


图 5 用 Ferguson 作图分析法对分离情况进行分类。详细内容见正文。

B: 蛋白质在自由溶液中具有较大的泳动率（其电荷密度较大），且分子较小。于是，基于分子大小和电荷量的分级分离作用是协同的，增加凝胶浓度，分离效果改善。

C: 蛋白质分子较大，其自由泳动率也较大，以致依据其分子大小和电荷量进行分级

分离的二因素具有拮抗性。此状况通常见于非解离系统。

D：蛋白质分子大小相同，但在自由溶液中的泳动率不同(诸如乳酸脱氢酶之类的同工酶，血红蛋白)。在这类场合中，增加丙烯酰胺浓度对两种蛋白质的相对分离无影响，人们应当考虑采用电聚焦或等速电泳之类基于电荷量进行分离的方法。

在聚丙烯酰胺凝胶电泳中，利用 Ferguson 作图法测定蛋白质的最佳分离及分辨条件的详尽说明参阅第 2 章。

分子量测定

天然蛋白质

天然蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳系根据分子大小和电荷差异进行分离。通过 Ferguson 作图(图 5)，去除电荷因素后，其斜率 K_R (阻滞系数)即为分子大小的量度。的确，由于 Hedrick 和 Smith[13] 发现 K_R 值和天然蛋白质分子量之间存在着线性关系，因此，首先通过利用一系列分子量已知的标准天然蛋白质，以其分子量对 K_R 作图，人们可以简便地测定出任何样品蛋白质的 K_R，然后参照标准曲线测出样品蛋白质的分子量。Rodbard 和 Chrambach[14] 论证了球状蛋白质的 $(K_R)^{\frac{1}{2}}$ 和分子半径之间存在更好的关系(见第 2 章)。尽管如此，测定天然蛋白质分子量的问题在于，只有当用来制作标准曲线的标准蛋白质具有相同形状及相同程度的水合作用和微分比容时才有意义。由于这一原因，目前用聚丙烯酰胺凝胶测定蛋白质的分子量，通常是在巯基试剂还原蛋白质二硫键后在 SDS 参与下进行。离子型去污剂 SDS 实际上消除了蛋白质分子间的构象和电荷密度差异，并减少其微分比容和水合作用的变化所带来的影响。然而，应当注意的是，由 SDS-PAGE 所测得的分子量是多肽亚基而不是天然蛋白质（若为低聚物时）的分子量。

变性蛋白质 (SDS-PAGE)

基本方法　　在过量 SDS 和巯基试剂(通常为 2-巯基乙醇或二硫苏糖醇)存在的条件下加热变性时，大多数多肽以一恒定量的比值结合 SDS，结果它们大体上具有相同的电荷密度，在适宜孔率的聚丙烯酰胺凝胶中，按照多肽分子的大小泳动。在这些状况下，以 10 为底的多肽分子量的对数（$\log_{10}$）对相对泳动率 (R_f) 作图，显示出直线关系[3,4]。因此，方法是电泳一系列已知分子量的标志多肽，利用每一标志多肽移动的距离作出标准曲线，从图中依据样品蛋白质在相同电泳条件下所获得的泳动率，可以计算出其分子量。若用柱胶，则标志多肽及样品多肽需要在不同的柱胶上电泳。由于同一多肽在不同的柱胶上电泳时，其移动距离有明显的差别，因此采用与染料前沿有关的 R_f 值表示迁移的距离是明智的。在染色定位多肽区带之前，可以在凝胶中插入一根细的金属丝，或注入印度墨水以标记染料的前沿位置。然而，更好的方法是利用板胶测定分子量，因为样品和标志多肽可以在同一凝胶上，所以是在完全相同的条件下电泳。在这种情况下，染色后可以非常简便地量度各多肽的移动距离(从分离胶顶部开始量度)，并以标志多肽分子量的对数（$\log_{10}$）与其移动距离作出标准曲线 (图 6)。其具体步骤参见下文。

必须强调指出，对于某一浓度确定的凝胶而言，分子量的对数（$\log_{10}$）和相对泳动率的线性关系，仅仅只在一定分子量范围内适用。作为 SDS-磷酸缓冲系统的一般规律，线性关系确实存在于下列范围：15% 丙烯酰胺适用于分子量 12,000—45,000；10% 丙烯酰

胺适用于分子量 15,000—70,000；5% 丙烯酰胺适用于分子量 25,000—200,000。采用其它的 SDS-不连续缓冲系统可以改善稀蛋白质样品的分辨率，此时对于 15% 丙烯酰胺凝胶而言，分子量范围相似时，仍呈现线性关系。然而对于 10% 和 5% 丙烯酰胺凝胶，若分子量分别小于 16,000 和 60,000，则多肽将在缓冲液前沿移动(图 6)。

多肽的异常行为　　在多肽与 SDS 以恒定重量比相结合的 SDS-PAGE 中，分子量的对数（$\log_{10}$）与泳动率之间确实存在着线性关系。因此蛋白质解离时，十分重要的是过量的 SDS 与多肽的比值至少应为 3:1，否则在合适条件下遵循线性关系的多肽也将

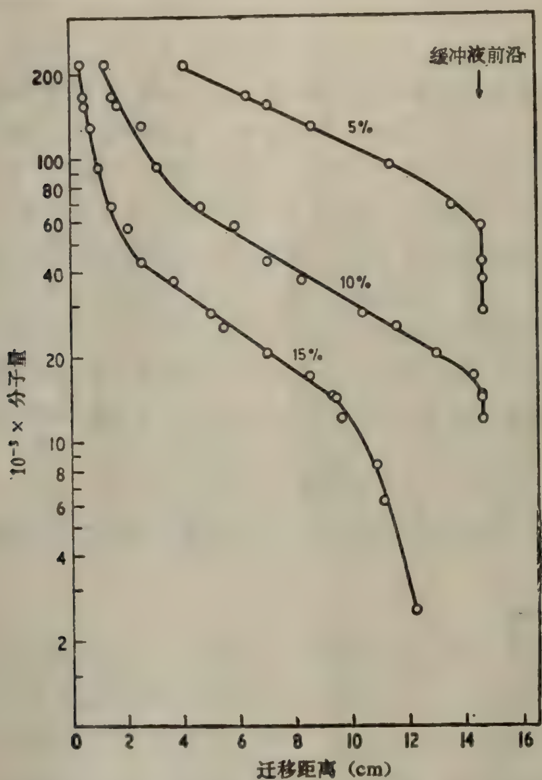


图 6　多肽在板胶上用 SDS-不连续缓冲系统进行 SDS-PAGE 时，其分子量的对数（$\log_{10}$）与移动距离的标准曲线。聚丙烯酰胺凝胶分别为 5%，10%，或 15%均一浓度。按分子量递减顺序排列，标志多肽为肌球蛋白（分子量 212,000），RNA 聚合酶 β′(165,000) 和 β(155,000) 亚基，β-半乳糖苷酶 (130,000)，磷酸化酶 a(92,500)，牛血清白蛋白 (68,000)，触酶 (57,500)，卵清蛋白 (43,000)，甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (36,000)，碳酸酐酶 (29,000)，糜蛋白酶原 A(25,700)，大豆胰蛋白酶抑制剂 (20,100)，马心肌球蛋白 (16,950)，马心肌球蛋白溴化氰裂解片段 I+II (14,404)，溶菌酶 (14,300)，细胞色素 C(11,700)，马心肌球蛋白溴化氰裂解片段 I(8,159)、II(6,214) 和 III(2,512)。马心肌球蛋白及其溴化氰裂解片段的分子量，系从参考文献 [129] 所列出的一级结构计算获得。其它多肽分子量参见表 6。

表现出非线性关系。为了保证二硫键的断裂，必须要有过量的巯基试剂，否则蛋白质将难于变性，也不能与 SDS 呈饱和状态结合。将蛋白质样品和分子量标志物在一系列不同浓度凝胶上电泳，并绘制出每一多肽的 Ferguson 图，便可以检查出异常现象。理论上，所有 SDS-多肽复合物具有相同的电荷密度，因而具有相同的 Y_0 值(图 5,A)。实际上，常不能获得这一理想情况，但是大多数具有“正常”行为的多肽大致接近这一状况，其 R_f 值与处于

或接近% T = 0 的标准多肽的 R_f 值相似(如图 7)，而异常的多肽其 Y_0 明显不同。

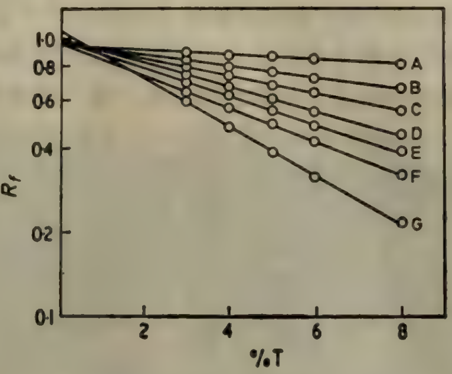


图7　用 SDS-PAGE 法获得的标准多肽 Ferguson 图的典型分析。 A，肌球蛋白； B，糜蛋白酶原； C，乳酸脱氢酶； D，卵清蛋白； E，谷氨酸脱氢酶； F，牛血清白蛋白； G，磷酸化酶 a。经允许从参考文献[127]中复制(也可参阅文献 [8，128])。

许多糖蛋白即使在过量的 SDS 和巯基试剂存在的条件下也显示出异常行为，其原因很可能是由于它们只是分子中的蛋白质部分与 SDS 相结合。由于与 SDS 结合降低，导致净电荷减少，多肽在电泳时泳动率降低，结果使测定的分子量偏高。但是，随着聚丙烯酰胺凝胶浓度的增加，分子筛作用超过电荷作用，糖蛋白的表观分子量降低，并接近其真实分子量。基于这一点，Segrest 和 Jackson[15]提出了一种测定糖蛋白分子量的方法，方法是在一系列聚丙烯酰胺凝胶浓度中，以标准蛋白质作参比，测定糖蛋白的表观分子量，以获得一接近糖蛋白真实分子量的最小分子量 (图 8)。另一种方法是利用浓度梯度凝胶。

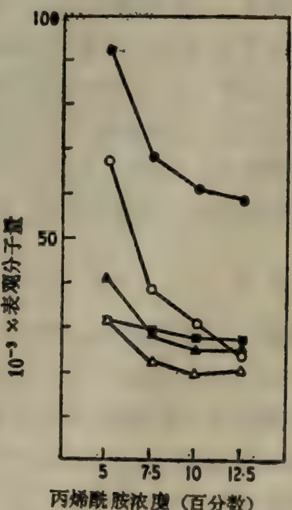


图 8　用不同浓度的丙烯酰胺凝胶电泳测定糖蛋白的分子量[15]。 人红细胞糖蛋白(●)； 人红细胞膜经胰蛋白酶水解的糖蛋白 (○)； 人红细胞膜糖肽片段(■)； 高分子量猪核酸酶(▲)； 低分子量猪核酸酶 (△) (经允许从参考文献[15]复制)。

强碱性蛋白质，如组蛋白，在 SDS-PAGE 上也显示异常行为，移动时比根据其已知分子量所预期的速度慢。

最后，若以 SDS 作唯一的解离剂，在均一浓度的聚丙烯酰胺凝胶中，即使其浓度为15%，也不能成功地分离分子量低于 10,000 的多肽(图 6)。在含有高百分浓度交联剂的 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶中，合并使用 8 mol/L 尿素和 SDS，能够改善这些寡肽的分离效果。

在浓度梯度凝胶上进行 SDS-PAGE　过去，虽然用 SDS-PAGE 进行的多肽分子量测定，普遍采用均一浓度的丙烯酰胺凝胶，但最近已越来越多地应用浓度梯度凝胶来达到上述目的。

糖蛋白在横坐标所示的各种均一浓度的聚丙烯酰胺凝胶中，用 SDS-磷酸缓冲系统电泳。通过比较糖蛋白与已知分子量的标准多肽的泳动率，测出每一糖蛋白在该凝胶浓度下的表观分子量。从丙烯酰胺浓度增加而糖蛋白的表观分子量降低中，说明糖蛋白在 SDS-PAGE 上的行为异常；非糖基化的多肽在各种浓度的丙烯酰胺凝胶中，显示出相同的分子量。虽然图中各糖蛋白所显示的接近最小分子量与其真实分子量相近，但即便用这种作图法[15]，含唾液酸和不含唾液酸的糖蛋白的行为也表现出明显的差异，因此，测得的任何未知糖蛋白的分子量仍然仅仅是近似值。

仪　　器

成胶装置和贮液槽

电泳时，电流通过凝胶产生热量。由于移动中离子的泳动率随温度升高而增加，显然，若需要重现电泳分离效果，则必须控制温度。此外，若热效应显著时，则从凝胶中心到凝胶表面将形成温度梯度，它将引起蛋白质在凝胶中心处的移动比在凝胶表面快，并导致蛋白质区带扭曲。温度升高还能使不稳定的蛋白质失活。

实际温度取决于产热速度与散热速度。产热速度与通过的电流成正比，因此，采用低导电性缓冲液，或者若必须采用高导电缓冲液时，用较低的输入功率和延长电泳时间，便可以减少产生的热量。后文将述及适宜的缓冲系统及电泳条件。采用柱胶和尽可能薄的板胶以利于散热，但板胶足够厚以便对样品有适当载量。实际上，用于分析性的蛋白质单向区带电泳，其凝胶厚度不应超过 0.6 cm，最好小于 0.6 cm。此外，在非解离缓冲系统中，电泳分离不稳定的天然蛋白质最好在具有某种冷却凝胶设备的仪器上进行。由于温度的微小变化所引起的多肽样品泳动率的微小变化，可以通过分子量标志多肽泳动率的改变来补偿，所以，在板胶电泳仪中用 SDS-PAGE 对蛋白质混合物作单纯的比较分析时，通常不需要冷却。然而，和其它各种缓冲液一样，以 SDS-PAGE 定量研究蛋白质的泳动率，必须精确控制温度(见第二章)。

柱胶电泳仪

凝胶得以在内形成的圆柱状管应以玻璃制成，用于单向电泳分离的玻璃管内径通常为 0.4—0.6 cm，壁厚 0.1 cm，某些双向分离的柱胶常常更细(第 5 章)。由于有机玻璃管不能象玻璃管一样有效地散热，因此，在蛋白质的分析性区带电泳中应避免使用有机玻璃管。玻璃管确切的长度因实验室而异，取决于使用者个人的经验。一般来说，玻璃管应比凝胶总长度约长 2—3 cm。常用的长度为 12 cm，它既能用于仅有 9—10 cm 分离胶的连续缓冲系统，又能用于具有相同长度的分离胶，但又外加约长 1 cm 的浓缩胶的不连续缓冲系统。整个玻璃管的直径应当均一，其末端应烧制光滑。

制备凝胶时，玻璃管必须严格保持垂直状态，以保证形成一个水平而清晰的弯月面。可从市场上购买以这种方式固定凝胶管的支架，实验室中也很容易用木条和适当大小的夹子制做。电泳时，将柱胶移至如图 9 所示的电泳仪中。仪器主要用有机玻璃制成。凝胶管用托在上贮液槽底部小孔中的硅橡胶垫圈悬挂；不需要的小孔全部用橡皮塞堵住。

在展示的电泳仪中，柱的大部分凝胶浸在能用套层中的水冷却的下贮液槽内。重要的是铂电极与每一凝胶管的距离应当相等,因此电极应呈环状,并置于槽的中央。较简易的电泳仪无冷却水套,仅靠下贮液槽的大热容量来达到冷却目的。更复杂的电泳仪,其上贮液槽可互换,因而能够托住不同直径的柱胶,同时还有若干其它改进(第 2 章)。

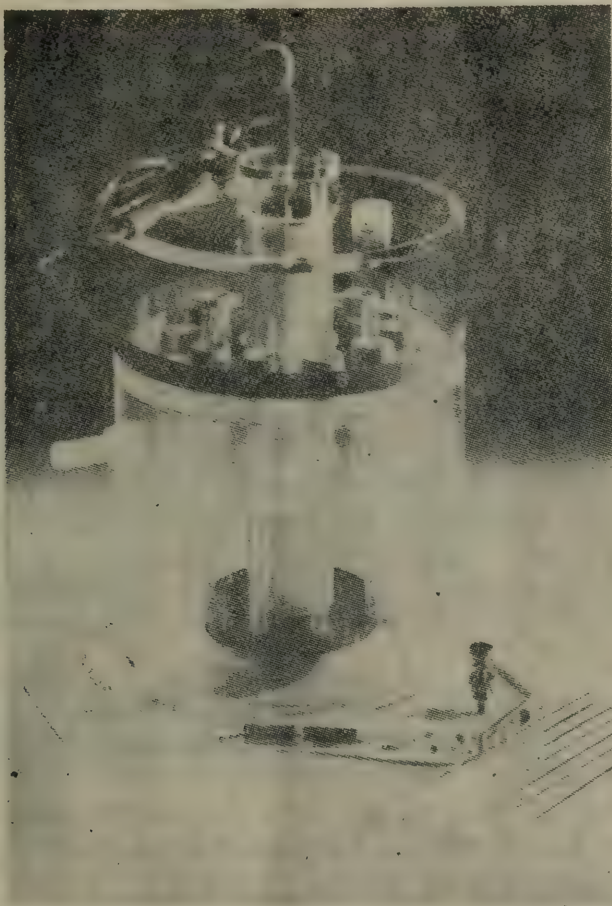


图 9　一种典型的柱胶电泳仪。所示模型（Bio-Rad 150 A 型）由有机玻璃制成,还配备带有冷却水套的下贮液槽，以及托住 12 支外径 0.7—0.85 cm（可选 0.5 cm)、长 15 cm 的玻璃管。更新的型号（Bio-Rad 155）系采用中心冷却，而不用冷却水套，且上贮液槽可互换,以便托住外径 0.4—1.7 cm 的玻璃管。

板胶电泳仪

已设计出用于蛋白质和核酸分级分离的垂直或水平板胶电泳仪。蛋白质的等电聚焦及免疫电泳大多仍利用水平板胶电泳,而蛋白质的聚丙烯酰胺板胶的区带电泳,目前几乎总是以垂直的方式进行;的确,不连续缓冲系统的分离只能在垂直的凝胶上完成。最普遍采用的仪器之一是由 Studier 设计的[16]，图 10 展示了根据这种装置改进的电泳仪，实验

室中很容易制作。电泳仪主要由两只用一块完整的有机玻璃支架托住的贮液槽组成，在上贮液槽刻有一槽口。凝胶在两块厚约 0.3 cm 的玻璃板中形成。其中一块玻璃板呈矩形，17 cm × 19.5 cm，第二块与第一块玻璃板大小相同，但在 17 cm 的一端开一个深 2.0 cm 和长 14 cm 的缺口。将两块玻璃合起来并在两板之间垂直方向的边缘，安放有机玻璃垫片(长 22.0 cm，宽 1.0 cm 和厚 0.15 cm)以形成凝胶模具。凝胶聚合时，利用有机玻璃的样品梳在凝胶中形成样品池，改变梳齿的数目及尺寸能方便地改变样品池的数目和大小。某些有用的样品梳可参见图 10。下文将详述这种板凝胶的灌注方法。用弹性大的金属弹簧夹将夹在两块玻璃板之间的聚合凝胶安装在电泳仪上，让有槽口的玻璃板与上贮液槽缺口紧密接触,并排成一条线,以便凝胶上部与上贮液槽中的缓冲液接触。凝胶底部浸人下贮液槽的缓冲液中。由于在一块板胶上可分析多个样品，所以铂电极安放在与每一样品等距离的位置上,即处于上、下贮液槽之中的长边方向上。从许多厂家也能购置相似的电泳仪(如 Raven Scientific Ltd., Bethesda Research Labs Inc.)。

重要的是应该指出,利用这种电泳仪时,多数凝胶是不冷却的，研究者依靠使用极薄的 (0.75—1.5 mm) 板凝胶有效地散热。这种电泳仪在室温下进行 SDS-PAGE 效果很好。然而,使用过高的输人功率时,必须谨防超过板胶的散热能力；否则由于凝胶中心区域温度较周围部位高,以致位于中央部分的多肽比位于边沿部分的泳动快,结果多肽组分呈现弯曲图象。采用某些市售的可冷却垂直板凝胶电泳系统中任何一种(如图 11),在较高电压下用较短时间进行 SDS-PAGE 分离，可以防止出现上述效应。尽管如此,价格低廉制作简便的 Studier 型电泳仪,足以满足大多数用 SDS-PAGE 作多肽样品组分的比较研究及测定分子量的需要。不稳定天然蛋白质在非解离缓冲系统中的电泳分离，最好利用冷却的板胶电泳仪在 4—8℃ 下进行。

电泳所需要的其它装置

除标准的实验室玻璃制品及磁力搅拌器外，其它可能需要的装置如下:

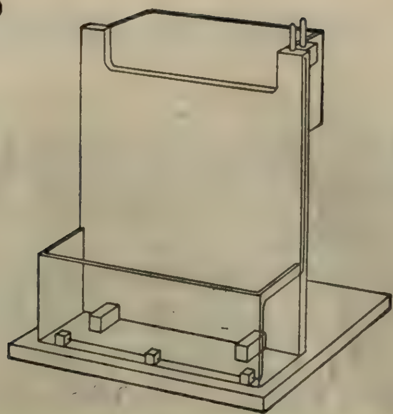
(i) 一只 15 W 日光灯：用于使核黄素催化的聚丙烯酰胺凝胶发生光聚合作用。

(ii) 微升注射器或微量吸管：用来将样品加于凝胶上。也可以用其它的代用品，如各种带塑料头的可调式移液器，微量头 (microcape)(经校正体积已知的玻璃毛细管)和已校正的活塞式微量注射器。在柱胶上加试样时,选择哪种吸液器由个人爱好决定,但在需要细心地加样于板胶上细而窄的样品池时，最好配备一支 50 μl 或 100 μl 的微量注射器。

(iii) 一台泵：用于制备丙烯酰胺浓度梯度凝胶，也用于细心地铺制板面平整的凝胶。

(iv) 一套电源组件：能提供 500 V 电压和 100 mA 左右的电流。在许多情况下是否应当使用恒定电流或恒定电压条件并不重要，但装备一台多功能电源以便适用于其它方式的操作是值得的。虽然能够组装简易、价廉而又常能满足要求的电源,但已有若干适用的电源作为商品供应。若凝胶进行电泳脱色,那么拥有另一台电流输出量大 (1—2A)、电压低的电源部件是值得的;实际上,一组汽车电池充电器即足以胜任。

(a)



(b)

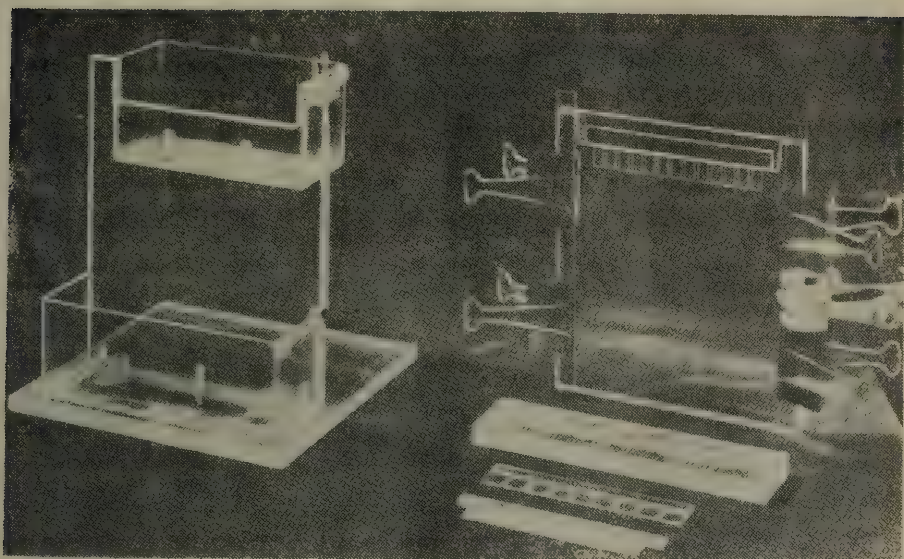


图 10 Studier 型板胶电泳仪。(a) 电泳仪的外形图，(b) 电泳仪及供制备板胶用的有槽玻璃组合部件的摄影图。电泳仪由有机玻璃构成，其中包括 20.5 cm×20.5 cm×0.9 cm 底座及由底座支撑着的一块大小为 21.3 cm×17.8 cm×0.9 cm 并在 17.8 cm 一端开有一条深 3 cm、长 14 cm 缺口的垂直板。 边长为 17.8 cm 的另一端则粘接在距底座边沿一端 12.5 cm 的底座上。上贮液槽的底部及三条边均由 0.3 cm 厚的有机玻璃板制成，形成长 14.6 cm、宽 6.0 cm、深 7.0 cm (从外围测量) 的小槽。小槽固定在电泳仪的垂直板上，令垂直板成为小槽的第四面，并与槽的上部边沿齐平。 下贮液槽长 17.8 cm、宽 6.0 cm、深 6.5cm、(从外围测量)，由一块厚 0.3cm、长 29.8cm、宽 6.5cm 的有机玻璃板构成槽的三边，然后粘接到垂直板的下部 (垂直板的一部分作为槽的第四边) 和电泳仪的底座上 (构成槽底)。两块 2.5 cm×0.9 cm×0.9cm 的有机玻璃板胶着在下贮液槽的底部，两者相距 12 cm (从二长方体的中心计算) 并与垂直板相连，成为板胶玻璃板夹层的支持物。铂丝电极分别通过上、下贮液槽的后部和前部，用小块胶着的有机玻璃板固定。电极与装在上贮液槽侧面的有机玻璃板 (3.0cm×1.5cm×1.5cm) 上的插头连接。出于安全目的，可以用厚 0.3 cm 的有机玻璃制作盖子，并安装一个与电泳仪上插头相连的插座，然后与电源相连。只有盖上盖子才能接通电源。电泳时用电扇吹风常有助于板胶冷却。这时，电泳仪插头与电源组相连而未加盖，但必须认识到这种作法对安全构成潜在的危险。板胶玻璃板及边沿垫片的大小可参阅正文。用来形成样品池的样品梳用 0.15cm×2.5cm×13.0cm 的有机玻璃条制成，其 13.0cm 一侧切有 1.25cm 深的梳齿。未切成梳齿的另一侧与一条使样品梳在使用时保持水平的有机玻璃条 (0.15cm×1.25 cm×13.0 cm) 粘接起来。我们感到图 10 玻璃板夹层部位中所显示的样品梳较为适用，它具有合适的齿间距 (齿宽 0.7 cm，间距 0.25cm)，13 个大小适中的样品池，可以同时分析多个样品，然而样品池的数量及大小完全取决于研究者的倾向。凝胶聚合时，玻璃板夹层密封的方法之一是用紧靠玻璃板夹层前部所示的有机玻璃槽密封，详情参阅图 12 的说明。

聚丙烯酰胺凝胶的制备和电泳

试剂

丙烯酰胺和双丙烯酰胺　　丙烯酰胺和双丙烯酰胺均为神经性毒剂，因此，处理含有这类试剂的溶液都应戴薄塑料手套，不得用口吸移液管。聚丙烯酰胺本身无毒，但通常含有一定数量的未聚合的有毒单体。

目前有几个厂家供应高纯度的丙烯酰胺及双丙烯酰胺，它们极其成功地应用于大多数的研究工作而不必进一步纯化。必要时可以用某些溶剂将丙烯酰胺和双丙烯酰胺重结晶。一种方法是在50℃下将70 g丙烯酰胺溶于1 l氯仿中，自然过滤热溶液并在 −20℃存放使其重结晶。用过滤方法收集结晶，以冷氯仿稍加洗涤，然后在真空干燥器中充分干燥。双丙烯酰胺系将10 g粗制品50℃下溶于1 l丙酮中，热过滤后保存于−20℃处。过滤收集结晶，用冷丙酮稍加洗涤后干燥。

SDS　　虽然有几种规格的 SDS 商品供应，但只能应用高纯度的试剂。SDS-PAGE 中有许多问题可以归因于所用的 SDS 纯度；Swaney 等[17]指出，多肽混合物的整个泳动图象（以及表观分子量）随 SDS 的来源而异。这一现象仅在 SDS-不连续缓冲系统而不是在连续 SDS-磷酸系统观察到。幸而可以从许多厂家（如 BDH Chemicals Ltd., Bio-Rad

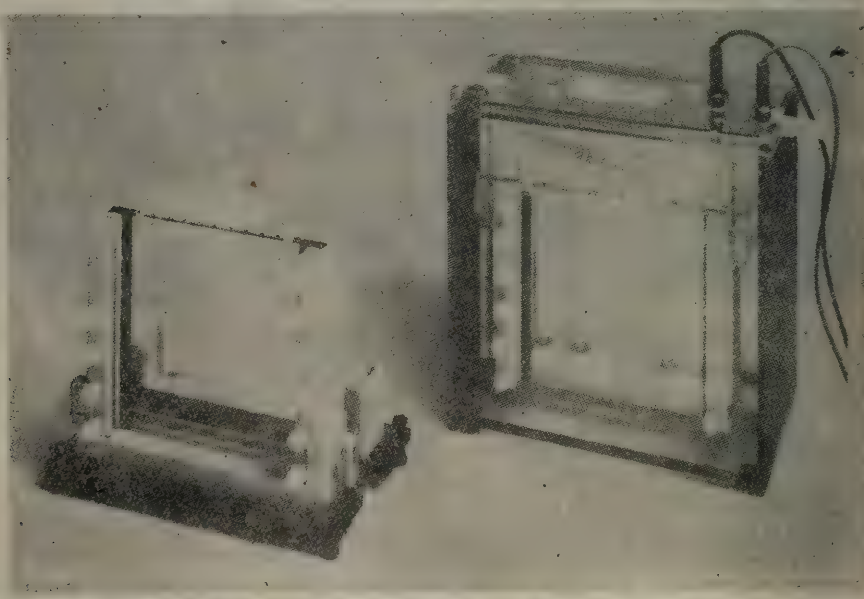


图11　可冷却的垂直板胶电泳仪。所展示的型号系由 Bio-Rad Laboratories Ltd 生产的 Protean Cell 型（由 Hoefer Scientific Instruments 制造）。可以同时电泳两块板胶。每块板胶是在两块均未开槽的玻璃板（16.0cm×18.0cm×0.3cm）之间形成，玻璃板之间用厚0.075，0.15，0.3或0.6 cm 的聚乙烯碳酸酯（PVC）作垫片隔开，垫片放置在两块玻璃板之间垂直方向的两边，并用塑料夹夹住。夹层底部用压在铸形架硅橡胶垫片底部的聚碳酸酯凸轮密封，如上图左侧所示。凝胶注入后令其聚合，样品池的形成及加样如正文所述。从铸形架上取下板胶夹层，用相同的凸轮系统将其紧紧固定在上贮液槽另一硅橡胶垫片上。上、下贮液槽均注满缓冲液，下槽中缓冲液用流经位于二块凝胶板之间的玻璃管换热器的冷却剂来冷却，并用磁力棒搅拌器搅拌。LKB Instruments Ltd 出售一种由 Hoefer Scientific Instruments 制造，并与上述电泳仪非常相似的可冷却板胶电泳仪。还有几种其它类型的可冷却垂直板胶电泳仪商品。这些板胶中有许多是由橡皮垫圈而不是由凸轮操作的密封系统固定在上贮液槽上。

Laboratories Ltd.）购到适用于电泳的高纯 SDS。然而应当劝告人们，只能选择和使用同一来源的 SDS。必要时可用乙醇将 SDS 重结晶,即将大约 200g SDS 溶于 3 l 沸腾乙醇，常压下趁热过滤,在 4℃ 下存放以便 SDS 重结晶，过滤收集结晶并干燥。

尿素　　使用尿素的主要问题在于化学异构作用使贮备液中的氰酸盐离子积聚。氰酸盐与氨基反应形成氨甲酰基衍生物，于是改变了蛋白质的电荷量。若此反应进行不完全，将产生几种电荷量不同的蛋白质的假象。最简单的补救方法是使用新制备的尿素溶液及在允许的情况下，在缓冲液中加入其游离氨基可以中和氰酸盐离子的 Tris。由于氰酸盐离子的生成随温度的升高而增加,所以如有可能,应避免加热含尿素的溶液。正确的操作是在应用之前,将尿素溶液通过一个混合离子交换树脂柱,以去除离子。

TEMED　　使用的 TEMED 应为无色液体。多数商品来源的 TEMED 其纯度至少为99%。

使用的其它各种试剂均应为最高纯度。

贮备液

详细的方法步骤随凝胶的类型及所选用的缓冲系统而变化，但某些化学药品及溶液在许多方法中是通用的,因而进行如下概述。贮备液一旦制成,其中大部分在所述及的条件下可以稳定几个月,因而研究者如欲试验不同的凝胶系统,仅需制备新鲜的缓冲液。

(i) 丙烯酰胺-双丙烯酰胺 (30:0.8): 30 g 丙烯酰胺和 0.8 g 双丙烯酰胺溶于水中，使最终体积为 100 ml。用 Whatman No.1 滤纸过滤并在深色瓶中于 4℃下贮存。长期贮存时,丙烯酰胺单体将水解产生丙烯酸和氨。为了保证实验结果的重现性,每次只应当制备供用 1—2 个月的丙烯酰胺-双丙烯酰胺贮备液。

(ii) TEMED: 应用原包装液。未经稀释的液体 4℃ 下贮于深色瓶中是稳定的。

(iii) 过硫酸铵 (1.5%,重量/体积): 0.15 g 过硫酸铵溶于 10 ml 水中。这种溶液不稳定，应在用前制备。

(iv) 核黄素 (0.004%，重量/体积): 4 mg 核黄素溶于 100 ml 水中。溶液贮于深色瓶中 4℃ 下稳定。

(v) SDS(10%，重量/体积): 10 g SDS 溶于水中，至最终体积为 100 ml。溶液应透明无色。若水温过低，SDS 仅部分溶解,需将溶液加热。室温下溶液在数周之内稳定,但

表 1　制备 SDS-磷酸(连续)缓冲系统的凝胶的配方

贮备液	丙烯酰胺的最终浓度 (%)[a]							贮液槽缓冲液[b]
	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	
丙烯酰胺-双丙烯酰胺 (30:0.8)	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	—
0.5mol/L 磷酸钠，pH7.2	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	200
10% SDS	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	10
1.5%过硫酸铵	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	—
水	2.2	4.7	7.2	9.7	12.2	14.7	17.2	790
TEMED	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	—

a. 纵行为制备 30 ml 凝胶混合液所需要的各种试剂的体积 (ml)。
b. 制备 1L 贮液槽缓冲液所需试剂的体积 (ml)。

遇冷则产生沉淀。

(vi) 电泳缓冲液：所需要的确切的缓冲液取决于所选择的缓冲系统(见下文)。

凝胶混合液的制备

上表所列配方凝胶混合物的数量,可以满足制备 12—15 支柱胶或一块标准尺寸板胶的需要。不连续缓冲系统中的浓缩胶混合物的体积，足以满足在浓缩胶聚合前冲洗分离胶的表面并聚合浓缩胶。在任何浓度已确定的 TEMED 中,高浓度凝胶常比低浓度凝胶聚合更迅速。因此，上表给出的 TEMED 体积只是一种参考数值，应当调整 TEMED 的体积,以便能在 10—30 分钟内使凝胶聚合。

解离缓冲系统 (SDS-PAGE)

表 1 和表 2 分别详尽地列举了 SDS-磷酸(连续)系统(大体上依据 Weber 和 Osborn 所述[4])及 SDS-不连续缓冲系统(基于 Laemmli 方法[7]) 中,缓冲剂的组成及凝胶混合物制备的资料。注意 SDS-不连续系统中浓缩胶的丙烯酰胺浓度是恒定的，而不考虑分离胶所选取的丙烯酰胺浓度。

非解离缓冲系统

各种蛋白质对离子强度、离子种类和所需的辅助因子的敏感性有很大差别。因此,区带电泳天然蛋白质所选择的缓冲液完全取决于所研究的蛋白质。

pH 3 至 10 的任何一种缓冲液几乎都可以用于连续缓冲系统的电泳。一般说来，只

表 2 制备 SDS-不连续缓冲系统凝胶的配方

贮备液	浓缩胶(过硫酸铵作催化剂)	浓缩胶(核黄素作催化剂)	分离胶中的丙烯酰胺浓度(%)[a]							贮液槽缓冲液[b]
			20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	
丙烯酰胺-双丙烯酰胺(30:0.8)	2.5	2.5	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	—
浓缩胶缓冲贮备液[c]	5.0	5.0	—	—	—	—	—	—	—	—
分离胶缓冲贮备液[d]	—	—	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	—
贮液槽缓冲贮备液[e]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
10% SDS	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	—
1.5%过硫酸铵	1.0	—	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	—
0.004%核黄素	—	2.5	—	—	—	—	—	—	—	—
水	11.3	9.8	4.45	6.95	9.45	11.95	14.45	16.95	19.45	900
TEMED	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	—

缓冲液的最终浓度：浓缩胶：0.125 mol/L Tris-HCl，pH6.8；分离胶：0.375 mol/L Tris-HCl，pH8.8；贮液槽缓冲液：0.025 mol/L Tris，0.192mol/L 甘氨酸，pH8.3。

a. 纵行中数字为制备 30 ml 凝胶混合物时所需各种试剂的体积 (ml)。

b. 制备 1L 贮液槽缓冲液所需试剂的体积 (ml)。

c. 浓缩胶缓冲贮备液：0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)：6.0 g Tris 溶于 40 ml 水中，用 1 mol/L HCl (约 48ml) 调节 pH 至 6.8，加水至 100 ml。溶液用 Whatman 1 号滤纸过滤并于 4℃贮存。

d. 分离胶缓冲贮备液：3.0 mol/L Tris-HCl (pH8.8)：36.3 g Tris 和 48.0 ml 1 mol/L HCl 混合，加水至 100ml。用Whatman 1 号滤纸过滤后贮于 4℃。

e. 贮液槽缓冲贮备液：0.25 mol/L Tris，1.92mol/L 甘氨酸，1% SDS (pH8.3)：30.3g Tris，144.0g 甘氨酸及 10.0g SDS 制备成 1L 水溶液并贮于 4℃。

有离子强度较低因而导电性弱的溶液适于作为电泳缓冲液,因为它生热少。另一方面,若离子强度过低,蛋白质可能发生凝聚。显然,能满足上述条件的缓冲液浓度,取决于选用的特定缓冲离子及所研究的蛋白质的性质。但总的说来,电泳液的浓度范围约为0.01 mol/L 至 0.1 mol/L。广泛采用的典型缓冲系统为 Tris-甘氨酸(pH 8.3—9.5);Tris-硼酸(pH 8.3—9.3);Tris-醋酸(pH 7.2—8.5);Tris-柠檬酸(pH 7.0—8.5)。通常 Tris 浓度为 0.02—0.05 mol/L。对于碱性蛋白质,可以采用 β-丙氨酸-醋酸盐(pH 范围 4.0—5.0),其中 β-丙氨酸的浓度为0.01—0.05mol/L。适宜 pH 的选择已在前文讨论。若发现在整个电泳过程中必须借助于还原剂以保持蛋白质的活性,可以在凝胶混合液中加入二硫苏糖醇(1 mmol/L)。一旦选定合适的凝胶浓度及缓冲液,即可按照表 3 的说明配制凝胶混合液,表 3 中所示的缓冲液为 5 倍浓度的缓冲液贮备液。

表 3 制备非解离连续缓冲系统凝胶的配方

贮备液	丙烯酰胺浓度(%)[a]							贮液槽缓冲液[b]
	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	
丙烯酰胺-双丙烯酰胺(30:0.8)	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	—
连续缓冲液(5 倍浓度)	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	200
1.5%过硫酸铵[c]	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	—
水	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	800
TEMED[d]	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	—

a. 纵行中数字为制备 30ml 凝胶混合液所需各种试剂的体积(ml)。
b. 制备 1L 贮液槽缓冲液所需试剂的体积(ml)。
c. 如有必要,可以 2.5ml 核黄素(0.004%重量/体积)代替过硫酸铵作聚合催化剂,并相应调节水的体积。在低 pH 值时,核黄素通常比过硫酸铵/TEMED 有效,而后者则在高 pH 值时更有效。
d. 若为低 pH 缓冲液,则需要增加 TEMED 的浓度。

表 4 列举了三种早期用于天然蛋白质电泳的不连续缓冲系统的详细资料。高 pH 的 Ornstein-Davis 系统应用最普遍,而低 pH 缓冲系统适用于碱性蛋白质。中性 pH 系统缓冲能力低,因此很少应用。但可以保存某些在偏酸或偏碱条件下不稳定的酶的活力。表 5 列出了用这三种缓冲系统制备凝胶混合液所需要的试剂体积。此外,第 2 章叙述了目前可应用的不连续缓冲系统用计算机输出的数值。

柱胶的制备

连续缓冲系统

1. 使用比凝胶长 2—3 cm 的玻璃管。重要的是应保证凝胶管绝对清洁,以便凝胶能均一地粘附于玻璃管上。将玻璃管浸入铬酸中过夜,用蒸馏水清洗,最后用乙醇浸洗并干燥即可达到上述要求。

虽然在电泳后,沿管壁注水常能方便地将浓度低于 12% 的柱胶从玻璃管中取出,但随着凝胶百分浓度的增加,取胶逐渐困难。为了使灌水法易于将凝胶移出,可用 0.5%二甲基二氯硅烷的四氯化碳无水溶液将玻璃管硅烷化(商品名 'Repelcote', Hopkin 和 Williams Ltd. 生产)。硅烷化试剂的使用说明由制造厂家提供,但应强调的是,这些试剂剧毒,使用时应当小心,应在通风良好的通风橱中进行。硅烷化玻璃管粘附性能减弱,意味着百分率较低的凝胶电泳时有可能从玻璃管中滑出。这一问题可以在电泳前,用一节长 2—3mm

表 4　非解离不连续系统的缓冲液

高 pH 不连续缓冲液[6]

在 pH 8.3 浓缩，pH 9.5 分离

浓缩胶缓冲液：Tris-HCl (pH 6.8)：6.0 g Tris 溶于 40 ml 水中，以 1mol/L HCl（约 48.0ml）滴定至 pH 6.8，加水至最终体积 100 ml。

分离胶缓冲液：Tris-HCl (pH 8.8)：36.3 g Tris 与 48.0 ml 1 mol/L HCl 混合，加水至最终体积 100 ml。必要时可用 HCl 滴定至 pH 8.8。

贮液槽缓冲液：Tris-甘氨酸 (pH 8.3) 应用的确切浓度是将 3.0 g Tris 和 14.4 g 甘氨酸溶于水，并稀释至 1L。

中性 pH 的不连续缓冲液[9]

在 pH 7.0 浓缩，于 pH 8.0 分离。

浓缩胶缓冲液：Tris-磷酸盐 (pH 5.5)：4.95 g Tris 溶于 40 ml 水中，以 1 mol/L 磷酸滴定至 pH 5.5。加水至最终体积为 100 ml。

分离胶缓冲液：Tris-HCl (pH 7.5)：6.85 g Tris 溶于 40 ml 水中，以 1 mol/L HCl 滴定至 pH 7.5。加水至最终体积为 100 ml。

贮液槽缓冲液：Tris-二乙基巴比妥酸 (pH7.0)：55.2 g 二乙基巴比妥酸和 10.0 g Tris 溶于水并稀释至 1L。

低 pH 不连续缓冲液[10]

在 pH 5.0 浓缩，pH 3.8 分离。

浓缩胶缓冲液：醋酸-KOH (pH 6.8)：48.0 ml 1 mol/L KOH 和 2.9 ml 冰醋酸混合，然后加水至最终体积为 100 ml。

分离胶缓冲液：醋酸-KOH (pH 4.3)：48.0 ml 1 mol/L KOH 和 17.2 ml 冰醋酸混合，加水至最终体积为 100 ml。

贮液槽缓冲液：醋酸-β-丙氨酸 (pH 4.5)：31.2 g β-丙氨酸与 8.0ml 冰醋酸溶于水并稀释至 1L。

表 5　制备非解离不连续缓冲系统凝胶的配方

贮备液	浓缩胶(以核黄素作催化剂)	分离胶中丙烯酰胺的浓度(%)[a]							贮液槽缓冲液[b]
		20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	
丙烯酰胺-双丙烯酰胺(30:0.8)	2.5	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	—
浓缩胶缓冲贮备液[c]	5.0	—	—	—	—	—	—	—	—
分离胶缓冲贮备液[c]	—	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	—
贮液槽缓冲贮备液[c]	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000（即未稀释）
1.5%过硫酸铵[d]	—	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	—
0.004%核黄素	2.5	—	—	—	—	—	—	—	—
水	10.0	4.75	7.25	9.75	12.25	14.75	17.25	19.75	—
TEMED[d]	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	—

a. 纵行内数字代表制备 30 ml 凝胶混合液所需各种试剂的体积 (ml)。

b. 制备 1L 贮液槽缓冲液所需试剂的体积 (ml)。

c. 贮备液按表 4 所述方法制备。

d. 对于以过硫酸铵作聚合催化剂的低 pH 不连续缓冲系统，其分离胶中的 TEMED 体积应当增至 0.15ml，并相应调节水的体积。低 pH 条件下，核黄素通常比过硫酸铵/TEMED 有效，而在高 pH 条件下，后者更有效。

的氯乙烯与酸乙烯共聚物 (Tygon) 管，将一片尼龙网(孔径约 100 μm)装在凝胶管的底部来解决。

2. 用玻璃刀或笔尖纤细而墨水不溶于水的笔，在凝胶管（只能在未硅烷化的玻璃管上）上标出所需凝胶长度的位置，另一端用蜡膜 (parafilm) 封口。

3. 置于架上的凝胶管，应严格保持垂直。

4. 决定分离胶的浓度后，除 TEMED 外，按表 1（SDS-磷酸盐）或表 3（非解离缓冲液）所指出的体积，在器壁厚的小烧瓶中，制备凝胶混合液并用水泵脱气一分钟。脱气除有助于重复聚合速度外，还可以防止在凝胶中形成气泡。

5. 加入适当体积 TEMED，迅速而又和缓地搅拌使其混合。立即将混合液注入各玻璃管达刻度处，应细心操作以免带入任何气泡。上述要求可以用一支 Pasteur 吸管或 10 ml 装有长钝针头的注射器，将尖端降至玻璃管底部后再排出凝胶液来实现。

6. 凝胶管一旦注满凝胶混合液后，随即在凝胶液上部覆盖一层厚约 0.5 cm、最好与凝胶缓冲液组成相同的缓冲液（也常以水代替），以隔绝氧气（氧抑制聚合作用），并保证凝胶表面形成平坦的弯月面。加入缓冲液时应当极其小心，避免加入的覆盖层与凝胶溶液相混合；若发生混合，在凝胶的顶端将形成一条丙烯酰胺浓度降低的扩散界面，并降低区带的清晰度。在凝胶上部覆盖溶液的方法有多种，最简便的方法或许是用一支带有针头体积小的注射器。注射器内吸满待加的缓冲液，擦干针头然后轻轻将不带液滴的针头与凝胶混合液的表面接触，针尖紧贴玻璃管壁。再将针尖提高 2 mm，留下一条湿的痕迹至凝胶的表面。针尖紧贴于管壁，将注射器内液体缓慢推出，同时提高针尖使其始终比液面高出 2 mm。此时，在凝胶混合液和覆盖液之间可以见到一条明显的界面。还有一些工作者愿意使用带有针头弯成 90° 的注射器，或用 Pasteur 吸管加覆盖液。无论应用哪种方法，重要的是加覆盖液时应尽可能少地发生混合现象。

7. 凝胶静置待其聚合（10—30 分钟）。在此期间任何振动都将导致形成凹凸不平的凝胶表面。聚合时，原有的分界面消失，而在稍低的部位出现另一分界面，此界面即为聚合后的凝胶表面。

8. 新分界面形成后，凝胶静置 10—15 分钟，然后除去水或缓冲液覆盖层。若凝胶随即使用，以贮液槽缓冲液清洗凝胶表面，并用此缓冲液覆盖。若能避免脱水，凝胶也可以贮存。贮存时，需除去覆盖层，凝胶表面用与凝胶中缓冲液组分相同且新配制的缓冲液冲洗。随后，将较多的缓冲液加于凝胶表面上，并用蜡膜或橡皮塞密封。

不连续缓冲系统

不连续缓冲系统二层凝胶的制备是先在管中聚合分离胶，然后在分离胶的顶部聚合浓缩胶。通常，浓缩胶的高度和体积应为样品的二倍以上。高约 1.0 cm 的浓缩胶足以适用于大多数样品，万一需要加体积大的稀蛋白质溶液样品，浓缩胶的大小应作相应的调整。

步骤 1—7 与上述连续缓冲系统的步骤 1—7 相同，但在凝胶管上二处作标志，一处标出分离胶欲达到的高度，另一处则在分离胶上部 1 cm 处标出浓缩胶的高度。凝胶管用按表 2（SDS-不连续缓冲系统）或表 5（非解离不连续缓冲系统）详述的方法所制备的分离胶混合液，充满到第一个标志处。

8. 待分离胶聚合后，立即倾去覆盖液，制备浓缩胶（见表 2 的 SDS-不连续缓冲系统或表 5 的非解离系统）。若反应用过硫酸铵作聚合催化剂，除 TEMED 外，将所有组分混合，然后在注入浓缩胶之前，加入适当体积的 TEMED。若用核黄素代替过硫酸铵，由于凝胶溶液光照后才能产生聚合，所以 TEMED 可以在灌注凝胶前的任何时候加在浓缩胶混合液中。

9. 用一支 Pasteur 吸管吸取少量浓缩胶混合液冲洗分离胶的表面，然后取出。每支

凝胶管再注入浓缩胶混合液至另一标志处，并按照上述步骤6详述的程序，用水或浓缩胶缓冲液覆盖在凝胶的上部。若浓缩胶以核黄素作聚合催化剂，在距凝胶2—5 cm处需放置一支日光灯，以起动聚合反应。

10. 浓缩胶聚合后，移去覆盖液，用贮液槽缓冲液清洗凝胶表面，弃去此液后，凝胶上的空间用贮液槽缓冲液充满。

凝胶制备后应及早使用，这是因为浓缩胶、分离胶及贮液槽缓冲液的不同对浓缩现象的发生极为重要，在贮存过程中这三种缓冲液因扩散作用而混合。一种简便的方法是在相应的位置上聚合分离胶，并用分离胶的缓冲液漂洗，随后在分离胶上覆盖同一缓冲液。凝胶在使用前才在相应部位上聚合浓缩胶。

板胶的制备

下述灌注板胶的方法适用于改进的板开槽口的 Studier 电泳仪(图10)，这类仪器广泛应用于 SDS-PAGE 的工作中。商业上提供的各种可冷却板胶电泳仪，不论使用的是有槽口的或无槽口的玻璃板，其凝胶板大小(包括凝胶厚度)以及密封玻璃板的方法都不相同。然而，灌注均一浓度聚丙烯酰胺板胶和制备样品池的方法大体相同，而与所用的仪器无关。所遇到的主要差别是玻璃板密封的方法不同。仪器制造厂家的说明书可供参阅。

制备板胶时，应戴合适的塑胶手套，以免皮肤蛋白质污染凝胶板。

连续缓冲系统

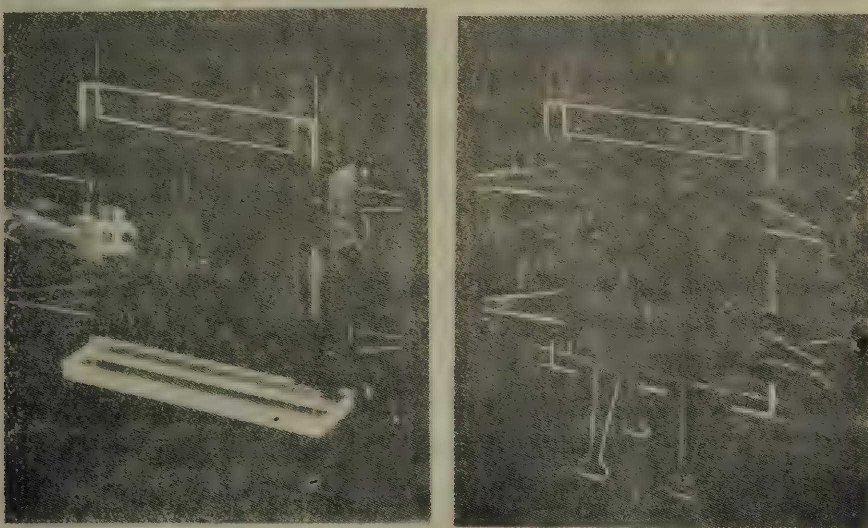
1. 象柱胶的制备一样，保证板胶的玻璃板极其清洁以便凝胶对玻璃有良好的粘着性甚为重要。玻璃板浸入铬酸中过夜后，先用水后用乙醇清洗使其洁净，然后将玻璃板与凝胶上部接触的一边放在清洁的滤纸上，并戴手套取一张用丙酮浸过的薄绸擦拭。最后以乙醇漂洗，令玻璃板在空气中干燥。

2. 通常用有机玻璃薄板或 Teflon 垫片将玻璃板隔开适当距离，无论是不同的垫片还是相同的垫片，其厚度必须均一，以便玻璃板接触良好，形成的凝胶厚度均一。常用的 SDS-PAGE 凝胶一般厚1.5mm，尽管也用厚0.75 mm的凝胶成功地进行过实验。有几种方法用来密封玻璃板夹层。对 Studier 有槽口的板系统[16]，我们尝试过的最早的方法是涂少量凡士林于垫片上，将这些垫片放置在未开槽口的玻璃板的边缘，再将有槽口的玻璃板面朝下放在垫片上面。进行上述操作应戴手套，操作应细心，将凡士林仅抹在板的边沿上，不得接触板的其它任何地方，用弹力大的金属夹将板组合在一起，金属夹应正好压在垫片上。然后将组合物垂直地放置在有机玻璃槽上(图12a)，并用10ml按下述步骤3的方法制备的丙烯酰胺混合液装满有机玻璃槽来密封底边。对于梯度凝胶、槽系用10ml浓度最大的丙烯酰胺混合液装满。待密封胶聚合后，再灌入丙烯酰胺胶。采用凝胶块密封玻璃板底部的优点是，当丙烯酰胺聚合后组合物即可进行电泳，而不必用其它方法作进一步处理。

另一种常用的组装方法是利用三个垫片，玻璃板组合物的每一垂直边放置一块垫片，另一块放置在底边（图12b)，密封的方法是组装前涂油脂，或组装后将2%融化的琼脂糖滴于组合物的边沿上，或用耐 SDS 缓冲液浸泡的特殊胶布（例如 UFT1/AT 胶布；Universal Scientific Ltd.）密封。待丙烯酰胺凝胶聚合后，于电泳前移去底边的垫片。

3. 灌胶过程中将夹紧的板组合物保持垂直位置，确定了适宜的分离胶浓度后，除

TEMED 外,取各成分相应的体积(见表 1 中的 SDS-磷酸盐或表 3 中的非解离缓冲系统)置入小的厚壁烧瓶中,以制备凝胶混合液。用水泵脱气 1 分钟, 加入 TEMED 轻轻地混合后,立即将凝胶溶液注入玻璃板之间,直至距顶部不足 0.5 cm。随即将有机玻璃样品梳插入两块玻璃板之间, 并浸入凝胶混合液中。梳齿应紧贴玻璃板上。需要特别注意梳子的下部不应含有气泡, 否则将形成形状不规则的样品池。



(a) (b)

图 12 密封玻璃板夹层底部的方法。(a) 利用在有机玻璃块(厚 1.25 cm, 宽 5.0 cm, 长 19.5cm)中铣出的一条有机玻璃槽(深 0.6 cm, 宽 1.3 cm, 长 19.0 cm), 装入玻璃板夹层后,容量约为 10 ml。(b) 三块垫片的用法。每一步骤的细节见正文。

4. 静置组合物待凝胶聚合 (10—30 分钟), 已聚合的依据是在凝胶/空气分界面下出现一条明显的分界线。再经历 10 分钟后细心地取出样品梳。

5. 若凝胶随即使用,取出样品梳后所形成的样品池, 用 Pasteur 吸管或装有针头的注射器吸取贮液槽缓冲液漂洗, 然后再用贮液槽缓冲液充满。取出样品梳时, 样品池的凝胶若被弄歪,可用一支注射针头或微型药勺拨正至垂直状态。若凝胶欲贮存备用,样品池应当用凝胶的缓冲液漂洗后, 再用同一缓冲液充满。

某些需要应用连续缓冲系统的场合,分离胶太脆,使样品池难于形成。这时可在分离胶顶部聚合一低浓度 (3.75—5.0%) 的胶即可克服这一困难。 这类胶中形成样品池的方法与不连续缓冲系统(见下文)所涉及的方法相同,但其凝胶浓度低,且缓冲液为分离胶的缓冲液 (如表 10)。

不连续缓冲系统

不连续缓冲系统需利用聚合于分离胶顶部的浓缩胶,于是样品池是在浓缩胶中形成。

1—2. 洗净凝胶板, 并按连续缓冲系统制备板胶的方法中所述及的步骤 1—2 组装。

3. 确定了适宜的分离胶浓度后,在一个小的厚壁烧瓶中, 按表 2 对 SDS-不连续或表 5 对非解离缓冲系统所列出的体积,将各组分 (TEMED 除外) 混合以制备凝胶混合液。用水泵将混合物脱气一分钟,加入适当体积的 TEMED, 并温和地混匀溶液。

4. 将分离胶混合液注入玻璃板之间空间，并使顶部留下足够的空间，以便随后聚合浓缩胶和制备样品池。浓缩胶的高度至少为样品高的二倍；大多数情况下 2cm 即满足要求。考虑到样品池的深度，这意味着在分离胶的上部需要留下 3.5 cm 的空间。所需要的分离胶的体积显然取决于凝胶的大小，若利用图 10 中所示的仪器，其体积为 30 ml。用装有细塑料管的蠕动泵或带有细管的注射器，将分离凝胶的缓冲液逐渐地铺在凝胶表面上。管尖的位置应当恰在凝胶的表面之上，同时又位于玻璃板的中央以便向内输送缓冲液。

5. 聚合后（10—30 分钟）的特征是在聚合凝胶及覆盖层之间出现一明显的界面，将组合物倾斜使覆盖的缓冲液流出。虽然可以聚合相应的浓缩胶并随即使用，但通常于使用前在分离胶上覆盖一层分离胶缓冲液，并放置过夜。

6. 按照表 2 SDS-不连续或表 5 非离解的缓冲系统中所列出的配方制备浓缩胶。

7. 取少量的浓缩胶混合物漂洗分离胶的表面。倾出后，凝胶板之间的剩余空间用浓缩胶混合液充满。

8. 将样品梳立即插入浓缩胶混合液中，避免在梳子下方有任何气泡。对于仅用核黄素催化浓缩胶的聚合作用，应在距凝胶 2—5 cm 处放置一支日光灯，以起动聚合反应。聚合浓缩胶时应将组合物静置。

9. 聚合后，细心地取出样品梳露出样品池，然后用贮液槽缓冲液漂洗，并用同一缓冲液注满。取出样品梳时，若样品池之间的间隔胶位置发生改变，可用注射器针头或微型药勺予以整直，应细心操作避免损坏。浓缩胶一旦聚合，板胶应立即使用。

样品制备

解离缓冲系统（SDS-PAGE）

重要的是不能使凝胶过量负载，否则区带将扭曲。板胶中一样品池加样过量也能引起相邻样品的区带电泳图扭曲。在另一种情况下，加样量过低可能使某些次要成分不能测出，甚至主要成分带染色后因着色太浅而无法摄影记录。因此在电泳前，用标准方法测定样品蛋白质的浓度是有益的。为了获得最佳效果，凝胶上每种多肽应加 1—10 μg，通常加 50—100 μg 复杂的混合物。加样体积也很重要。起始带的厚度即加样体积，对连续缓冲系统（SDS-磷酸盐）蛋白质区带的清晰程度有极大的影响，因此样品体积应尽可能地小。SDS-不连续系统的浓缩效应意味着这一方法基本上与体积无关，实际上在板胶电泳中，样品池限制了样品的体积，同时大体积样品需要的浓缩胶多，还出现多肽区带的旁路扩散。7 mm 宽的样品池厚 1.5 mm 的板胶，在加入 10—30 μl 样品时可以获得最佳结果，但若加入 60 μl 样品，结果仍令人满意。在柱胶中，加样体积也应当小，以便获得最适的分辨率，由于柱胶的横截面较大，加样量（微克水平）及样品体积可相应增加。

可以用许多方法来浓缩直接用于电泳分析时浓度过低的蛋白质溶液。这些方法是冰冻干燥、硫酸铵沉淀和对高浓度聚乙二醇（分子量 20,000）透析。此外，也可以令聚乙二醇固体与装有蛋白质样品稀溶液的透析袋的外部相接触。Sephadex G-100 或 G-200 也能以类似的方式应用。样品用上述任一方法浓缩后，对于 SDS-磷酸缓冲液系统，样品应对 0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液（pH 7.2）透析；对于 SDS-不连续系统，样品应对 0.0625 mol/L Tris-HCl（pH 6.8）透析，以便脱盐或除去可能干扰电泳的小分子的聚乙二醇杂质。由于钾离子沉淀 SDS，所以操作中必须予以除去。适当体积的 0.01 mol/L

磷酸缓冲液（pH7.2）或 0.0625 mol/L Tris-HCl（pH 6.8）样品蛋白质溶液，应用浓的贮备液调整，使其含 2% SDS，5% 2-巯基乙醇，10% 蔗糖（或甘油）及 0.002% 溴酚蓝。由于用 SDS-PAGE 测定分子量依赖于各种多肽均具有相同的电荷密度，即单位重量的多肽结合 SDS 的数量相等，因此溶液中存在过量的 SDS 是重要的。若样品蛋白质的含量已知，工作者应当计算 SDS 是否确实过量；至少必须是 3:1 的比值。对 SDS 不连续系统样品的缓冲液，加入 SDS 的浓度达 5% 也不会产生有害的影响。二硫苏糖醇可代替 2-巯基乙醇来裂解多肽的二硫键，它具有无臭及不易自动氧化的优点。蔗糖（或甘油）的加入系用来增加样品的密度，以便加样于凝胶上时样品能维持良好的覆盖层状态，在电泳初期不致与槽缓冲液发生对流混合。

浓缩蛋白质样品，尤其是样品数量较多的常用的方法是，用 10% 三氯醋酸（TCA）（冰水中维持 30 分钟）沉淀蛋白质，随后离心（10,000×g 5 分钟），再用乙醇-乙醚（1:1 体积/体积）反复洗去 TCA。除了能迅速浓缩大量样品外，还能同时除去干扰的盐类及某些不能透析的杂质。尽管如此，必须谨慎应用 TCA 沉淀法，因为某些糖蛋白和组蛋白溶于低浓度 TCA 中，而在其它场合，蛋白质可以沉淀，但若重新完全溶解样品于缓冲液中则极为困难。因此，在常规地应用 TCA 沉淀之前，检查这一方法对所研究的蛋白质的效率是有价值的。用乙醇-乙醚洗涤后，对 SDS-磷酸缓冲系统，TCA 沉淀可直接溶于 0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液（pH7.2），缓冲液中还含有 2% SDS、5% 2-巯基乙醇、10% 蔗糖或甘油、0.002% 溴酚蓝；对 SDS-不连续缓冲系统则溶于 0.0625 mol/L Tris-HCl（pH 6.8），该缓冲液也含有 2% SDS、5% 2-巯基乙醇、10% 蔗糖或甘油、0.002% 溴酚蓝。样品应呈蓝色。若呈黄色即表明样品中仍含有足以干扰电泳的 TCA，必须加入数微升浓 Na_2HPO_4（对 SDS-磷酸系统）或 Tris（对 SDS-不连续系统）以调节 pH。但是，过量地加入浓缓冲液，电泳过程中蛋白质的浓缩和分离可能产生问题，因此，更好的办法是一开始即彻底地清除 TCA。假若蛋白质颗粒在混合时不完全溶于中性溶液，可能是由于 SDS 的数量不足。

一种更为简便并能避免酸中和问题的方法是丙酮沉淀法。向样品中加入 5 倍体积冷丙酮，混合后于 −20℃放置 10 分钟。离心（10,000×g 5 分钟）收集沉淀蛋白质，通过反复沉淀洗涤。干燥后，将蛋白质颗粒直接溶于适当的样品缓冲液中，即可进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。就象用 TCA 沉淀一样，在常规地利用这类浓缩方法之前，验证所研究的蛋白质是否能完全沉淀是重要的。

电泳前，将 SDS-PAGE 的样品在沸水浴中加热 3 分钟。这一措施保证了蛋白质的变性。低温不能解离某些“亚稳态”蛋白质复合物，特别是某些可以逐步降解其它蛋白质样品的蛋白酶。加热后，令样品冷至室温。最后，极其重要的是，应当用离心法（10,000×g 5 分钟）除去各种不溶性物质，否则在凝胶电泳时它将引起蛋白质不规则地“成层”。样品可以立即使用或贮存于−20℃ 冰箱中。冷却时，SDS 从溶液中结晶析出，故贮存样品在用前必须加温。

某些蛋白质，特别是核非组蛋白，欲使大多数这类蛋白质进入凝胶，在 SDS-样品缓冲液中需要有浓度达 8 mol/L 的尿素。同样，免疫沉淀物及膜蛋白的 SDS-样品缓冲液，常加入尿素以促进溶解。加入尿素后的样品缓冲液不必加入蔗糖或甘油以增加其密度。若加样前样品必须加热，样品的缓冲剂应含有 Tris，目的是将蛋白质的氰化修饰作用减

至最小程度。

分子量标准品　　每当进行分析性 SDS-PAGE 时，同时电泳一组分子量已知的多肽是有益的。尽管这对于测定样品多肽分子量是必需的。若只是定性地了解样品蛋白质的组成，同时电泳多肽标准品也是有价值的，因为它提供了一个方法来量度各次凝胶电泳之间的重现性。表 6 列出了某些蛋白质标准品商品。每一标准蛋白质应溶于适当的样品缓冲液，其浓度为 1 mg/ml，100℃ 加热 3 分钟，分成小包装后冷冻贮存。进行样品分析时，取一小包装的分子量标准品融化，加温溶解沉淀的 SDS，与样品蛋白质同时在柱胶或同一板胶的平行样品池上电泳。电泳后，将凝胶染色，脱色，并量度样品和标志多肽泳动的距离。放射性标记的蛋白质样品的分子量，通过同时电泳放射性标记的标志蛋白质，随后用放射自显影或荧光显影来测定，标记蛋白质可在实验室合成[20]或购买市售商品。另一方法是，也可以加入未标记的标志蛋白质，染胶显示出每一成分的位置后，在自显影前用一小滴放射性墨水注射在染色带上，以便指出其位置。用标准多肽的数据作出分子量

表 6　标准多肽的分子量[a, b, c]

多　　肽	分　子　量
肌球蛋白(兔肌)重链	212,000
RNA 聚合酶 (*E. coli*) β′-亚基	165,000
β-亚基	155,000
β-半乳糖苷酶 (*E. coli*)	130,000
磷酸化酶 a (兔肌)	92,500
牛血清白蛋白	68,000
触酶(牛肝)	57,500
丙酮酸激酶(兔肌)	57,200
谷氨酸脱氢酶(牛肝)	53,000
延胡索酸酶(猪肝)	48,500
卵清蛋白	43,000
烯醇化酶(兔肌)	42,000
乙醇脱氢酶(马肝)	41,000
醛缩酶(兔肌)	40,000
RNA 聚合酶 (*E. coli*) α-亚基	39,000
甘油醛-3-磷酸脱氢酶(兔肌)	36,000
乳酸脱氢酶(猪心)	36,000
碳酸酐酶	29,000
糜蛋白酶原 A	25,700
胰蛋白酶抑制剂(大豆)	20,100
肌红蛋白(马心)	16,950[d]
α-乳清蛋白(牛乳)	14,400
溶菌酶(卵清)	14,300
细胞色素 c	11,700

a. 某些工作者也用几种蛋白酶，例如胰蛋白酶、糜蛋白酶及木瓜蛋白酶作分子量标准品，但它们有时可能引起其它多肽标准品的水解，因而删去。

b. 此处列出的多肽分子量主要来自参考文献 [4,89] 及附录 III 中所列出的参考文献。这些多肽分子量是在过量巯基试剂存在的状态下测定的。内容更为丰富的合适的多肽名称可从原始文献中查出。

c. 分子量分布范围从接近 12,000 至 68,000 之间十分适宜，但只有少数具有亚基结构的蛋白质适应以上范围。通过交联形成一系列低聚[18,19]的多肽来克服这一困难。可以购得这些多肽的试剂药箱。

d. 从参考文献 [129] 所列出的序列数据计算出来。

对数（$\log_{10}$）与泳动距离的校正曲线，然后根据样品多肽的泳动距离从曲线上测出其分子量。为了排除可能存在的异常性，至少应当在另一种浓度不同的凝胶中重复进行分析，并且表明所测定的分子量数值无明显改变。理想的情况是若能获得足够数量的样品，可在几种凝胶浓度中电泳，并作出 Ferguson 图。

非解离缓冲系统

加样品蛋白质于板胶上，每种成分在加样体积中含量为 1—10 μg，对于复杂的蛋白质混合物约为 100 μg。为了增加连续缓冲系统区带的清晰程度，蛋白质样品应当溶解于稀缓冲液中，其浓度为凝胶缓冲液的 $\frac{1}{5}$—$\frac{1}{10}$。缓冲液还含有 10% 蔗糖（或甘油）及标志染料(0.002%)，标志染料的选择由电泳时的 pH 决定。碱性 pH 的电泳分离，一般用溴酚蓝作标志染料，甲基绿则用于酸性 pH 的电泳。是否可以使用稀样品缓冲液取决于凝胶缓冲液的浓度，因为若样品缓冲液的离子强度过低，可能发生蛋白质凝聚。利用某种不连续缓冲系统进行分析，样品应当溶解在稀释至 $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{8}$ 的浓缩胶缓冲贮备液中，且含10%蔗糖(或甘油)及适当的标志染料(最终浓度 0.002%)。

用蛋白质沉淀(丙酮、乙醇或硫酸铵)，离子交换层析，Diaflo 膜滤器真空超滤，冰冻干燥，或用亲水多聚物如聚乙二醇或 Sephadex，能将稀样品浓缩，这取决于所研究的蛋白质。显然，用来浓缩 SDS-PAGE 样品的三氯醋酸沉淀法，不能用于天然蛋白质样品的浓缩。必要时，样品应对电泳缓冲液(不含蔗糖、甘油及标志染料)透析，以除去盐及其它能干扰电泳分析的低分子量杂质。再将所有样品离心(4 ℃下 10,000×g 15 分钟)，完全除去可能干扰电泳的不溶性物质，加入蔗糖或甘油使最终浓度为 10%，最后加入标志染料。

通常，制备天然蛋白质样品涉及的所有步骤均在低温（0—4℃）下进行，以降低使蛋白质活性丧失的变性作用和减小蛋白酶对样品的水解。蛋白酶抑制剂，如对具有丝氨酸活性中心的蛋白酶的抑制剂，苯甲基磺酰氟（PMSF，phenylmethylsulphony fluoride），有助于抑制蛋白酶的水解作用。所有这些蛋白酶抑制剂共同的问题是它们只能应用于不使研究的蛋白质失活的样品中。电泳一旦准备好，样品可以立即使用，或者贮于 4 ℃含甘油的样品缓冲液中。若蛋白质样品在上述条件下稳定，可冰冻保存。

加样和电泳

对任何缓冲系统加液体样品的方法对柱胶和板胶基本一样。本节列举的板胶加样法是针对 Studier 的开槽口玻璃板系统[16]，在此系统中，加样前板胶安装在电泳仪上。某些可冷却的商品电泳仪在未开槽口的玻璃板之间形成的板胶，只是在加样后才安装在电泳仪上。安装的方法随应用的商品电泳仪的类型而异(见图 11 图注)。

1. 从柱胶或板胶的底部除掉橡皮塞、蜡膜等凝胶形成物。将凝胶安放在电泳仪的相应位置上。柱胶装在固定于电泳仪上缓冲液槽的橡皮垫圈内（图 9)。将在开槽口的玻璃板夹层中形成的板胶用金属夹固定在电泳仪的位置上，令玻璃板夹层的槽口与上贮液槽的槽口对齐（图 13)。在玻璃板夹层和电泳仪之间夹入一块硅橡胶片(与有槽口的玻璃板大小相同)，以便将电泳仪和玻璃板之间密封。若硅橡胶片在用前稍加预热，可以获得良好的密封效果。另一种方法是沿电泳仪槽口涂抹一层凡士林，这样当玻璃夹层夹在相应位

置上时即可密封。

2. 加贮液槽缓冲液于电泳仪的下槽中。然后，重要的是从凝胶底部除去气泡，否则会妨碍凝胶和贮液槽缓冲液之间的电路接触均一。用一支弯头的 Pasteur 吸管排出气泡。柱胶排气泡的另一方法是用戴手套的指头轻弹凝胶管的顶部，很容易除去凝胶柱中的气泡。



图 13 板胶安装在 Studier 型电泳仪上。所示实例的密封是通过在玻璃板夹层与电泳仪之间夹一片硅橡胶垫来实现(见正文)。

3. 将柱胶或板胶电泳仪上所有不用的用来固定凝胶的孔道塞住，向上槽中加入电极缓冲液。

4. 查漏后，用一支 Pasteur 吸管吸取电极缓冲液注入板胶各样品池中，或者是柱胶的表面上以洗涤凝胶表面。也可以用贮液槽缓冲液充满凝胶表面上的空间，以除去所有的气泡。

5. 用微量注射器或微量吸管，细心地将样品加在凝胶表面上。加样器的顶端应保持在凝胶表面以上 1—2 mm 处，使加样时样品与贮液槽缓冲液的混合减至最低程度。浓样品液流入凝胶表面上并形成界限极其清晰的一层。若板胶中的空白样品槽都以等体积空白样品缓冲液注满，可以得到最好的结果。

6. 对于 SDS-PAGE 和在其它缓冲系统中带负电荷的蛋白质电泳，电源箱的正极与下槽相连，负极与上槽相连，这时的电源箱应处于关闭状态。若电泳带正电荷的蛋白质，则贮液槽的极性应颠倒。

7. 电源箱与外电源相连接，打开开关并调节输出到所需的电流和电压数值。电泳条件用恒流或恒压表示。虽然只有在恒压条件下电泳才能给与蛋白质以恒定的泳动率，但二种操作方式都允许。确切的电泳条件取决于应用的缓冲液和凝胶条件，通常需要在实验中确定。一般说来，电流太大有产生过热的危险，而电压过低又延长电泳时间，且由于区带的扩散作用而降低分辨率。对于 SDS-磷酸缓冲系统，样品进胶前每条柱胶加 4 mA 的恒定电流，待样品进胶后每 9 cm 柱胶加 6 mA 恒定电流，电泳的时间约为 3 小时 (5% 胶)、4 小时 (10% 胶) 或 8 小时 (15% 胶)。对于导电性低的 SDS-不连续系统，每条柱胶加 2—3 mA 恒流，或加 100 V 恒压可以在相似的时间内完成电泳。恒压下较长的柱胶电泳的时间成比例增加。同样，对于 SDS-不连续系统的板胶，其电泳条件取决于凝胶大小及凝胶浓度。对于前已述及的板胶形式，操作者对 10% 丙烯酰胺凝胶，可以在室温下用 50V 左右电泳过夜。百分浓度更高的板胶电泳过夜，则需要较高的电压。此外，板胶也可以在白天用 25—30 mA 的恒定电流电泳，或用 120 V 浓缩后随即用 200 V 恒压电泳。

非解离缓冲液的电泳条件变化极大，它取决于应用的缓冲液的导电性。通常每条柱胶不应超过 2 mA 和 100—200 V，以免过热。

电泳后的凝胶分析

操作凝胶时，为防止皮肤上的蛋白质转移到凝胶上，戴橡胶手套是十分重要的。此外，

由于聚丙烯酰胺容易粘在滤纸表面上，所以凝胶不应与滤纸接触。

凝胶的取出

除去边沿垫片，在未开槽口的一端轻轻地拆开玻璃板(以免损坏易碎的开有槽口的一端)，便可方便地取出板胶。让凝胶留在无槽口的玻璃板上。百分浓度较高的凝胶(丙烯酰胺约 10%以上)，可以用母指和食指在凝胶的底部细心地将它提起，并转移到合适的方形耐溶剂的塑料盘中（理想的盘子至少比凝胶长、宽 5 cm)，以便浸泡在缓冲液中或进行分析时所用的染色液中。有些工作者发现，可以用一把宽的塑料刮刀处理较低百分率的板胶。

柱胶的取出较困难。基本上可采用两种方法之一：即沿管壁注水将凝胶从完整的管中移出；或破碎凝胶管并洗去凝胶上的玻璃管碎片。沿管壁注水的目的是用水压将凝胶轻轻地从管壁上剥离，而不致损伤凝胶。一手握住柱胶，另一只手用一支装有长而细的钝针头(如 6 cm 的 23 号针头)，在凝胶表面和管壁之间注水，同时应缓慢转动凝胶（见图 14)。在硅烷化的玻璃管中，凝胶通常很容易滑出，所以操作应当在塑料盘上进行(不是在洗涤槽上!)。若凝胶不易剥离，则应在玻璃管的另一端进行同样的操作。必要时，在取出松动的凝胶的最后步骤中，在凝胶管的一端用一支 Pasteur 吸管球加压。这种沿管壁注水的方法能较好地取出低浓度聚丙烯酰胺凝胶(低于 12%左右)，但凝胶浓度达 12%以上，特别是当凝胶在未经硅烷化处理的玻璃管中聚合时，可能需要应用将玻璃管破碎的第二种方法。有几种破碎玻璃管的办法。也许最简便的方法是将凝胶管包在纸里，再放在老虎



图 14　用沿管壁注水法从玻璃管中取出柱胶。

钳夹板之间。夹紧夹板直至听到破碎声音,然后松开。凝胶管沿着其纵向破成碎片,用水洗去这些碎片，可得到完整无损的凝胶。另外，也可以用重锤从一端开始小心敲碎玻璃管，而不损伤凝胶。

一旦取出柱胶或板胶，必须标出凝胶的末端。此外，有时也需要标出标志染料的位置，以便随后用于 R_f 值的测定。 在凝胶染料前沿部位插入一段细金属丝（直径约 0.1 mm)，即可满足这两种要求。此外,也可以在这一部位注入少量印度墨水。

蛋白质的染色及定量

蛋白质浓度足够高的区带，可以直接在 280 n 处用光密度扫描来定位。将凝胶放在合适的石英槽中(或在石英管中操作)，用任何一种装备有凝胶扫描附件的适宜的现代分光光度计扫描。就象未反应的丙烯酰胺单体一样，许多单体贮备液中存在着各种紫外吸收杂质，它们产生高吸收的本底。虽然选用纯试剂和选择正确的聚合方案可以消除某些问题,但这一方法对大多数的应用仍不适用，因为蛋白质在 280 n 处的消光系数很低，光散射也可能是一个严重的问题。这些限制意味着只有大的组分才能被精确定量。由于这一原因，常用的方法是将蛋白质区带与容易观察的试剂反应，以提高蛋白质测定的灵敏度。某些试剂可以与任何种类的蛋白质发生反应而与生物活性无关,它将在下文中述及。这类试剂中,由于考马斯蓝应用简便且广泛,所以在早期研究中最常用的方法是考马斯蓝染色。

考马斯蓝染色

早期大多数的蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳工作中，采用(酰)胺黑（amido black）作染色剂,由于考马斯蓝远比胺黑灵敏,所以它几乎完全代替了胺黑。用考马斯蓝在窄的蛋白质区带上,通常可以测出 0.2—0.5 μg 的任何蛋白质，对某些蛋白质的染色定量至少可到 15 μg。

早期操作中,共同的特点是先在凝胶上固定蛋白质,然后将它们染色，但这些操作已为蛋白质固定和染色同时进行的方法取代。由于考马斯蓝主要是非极性的，通常使用其甲醇溶液，然后脱色从凝胶上除去过量染料。除非研究者希望检查不能进入分离胶的蛋白质，否则在分离胶染色前常弃去浓缩胶。

已应用各种不同配方的染色液,其染料,甲醇和醋酸的比例各不相同。常用的配方如下。

溶考马斯蓝 R250 于水:甲醇:冰醋酸 (5:5:2, 体积比)中,使浓度为 0.1%，应用前经 Whatman No. 1 滤纸过滤除去不溶性物质。每条柱胶放置在一只试管中并用染色液充满,室温下至少放置 4 小时。染色所需的最短时间与凝胶的厚度和浓度有关,凝胶浓度增加则染色所需的时间也增加。温度较高时例如 40—50℃，染色速度增加,但实际上让凝胶在室温下于染色液中放置过夜并于次日脱色，更为简便。板胶放置在盛有染色液的塑料盘中,若胶厚 1.5mm，则在室温下放置 4—6 小时即充分染色。有些研究者发现染色和脱色时,将板胶置于尼龙网上并悬挂在一有机玻璃架上更有效。曾报道高浓度 SDS 干扰考马斯蓝染色,但若每块胶用 10 倍以上体积的染色液染色，例如每一板胶用 500ml 染色液染色,即可避免 SDS 对染色的干扰。

染色后，应除去过多的染色剂，以便蛋白带能清晰可见。可应用两种不同的脱色方法：即扩散脱色或电泳脱色。在扩散脱色法中，将凝胶转移至含 12.5% 异丙醇的 10% 醋酸中。在室温下放置48小时期间，随着染色剂从凝胶滤除，不断地更换脱色液(温度较高则脱色较快)。虽然在这段时间里背景的颜色大部分被除去，但为了获得完全透明的背景，需要更长的脱色时间。用含 30% 甲醇的 10% 醋酸脱色更快，但脱色后的凝胶不应保存在这一脱色液中，因为蛋白质带也将脱色。另一种取代脱色液的方法是加入几克阴离子交换树脂，待染料从凝胶中渗出时即被吸附。有柱胶或板胶用的扩散脱色剂商品（如 Bio-Rad Laboratories Ltd.)，这些物质通常是一简适于吸附染料的树脂或活性碳。

由于考马斯蓝是阴离子染料，所以可用电泳法脱色。虽然可以从横向或纵向进行电泳脱色，但采用横向电泳脱色较好，因为这一方向凝胶电泳的距离较短，因而电泳所需时间较少。有柱胶和板胶横向电泳脱色仪商品，但在普通研究室工作间容易加工制造。凝胶放置在有孔的塑料片之间，水平电极置于二侧。脱色仪用 7 % 醋酸充满，并与一个能提供大电流（0.25—1.0 A）的商品电源器或一组汽车充电器(能发出～12 V，3 A)相连接。由于输入功率高，贮液槽应当装备有高效的冷却系统。脱色在 15—30 分钟内完成。重要的是应注意，若脱色进行过久，某些蛋白质区带也能发生脱色，弱染色带也可能完全脱色。

已报道过为了考察蛋白质区带图谱，不需要进行脱色的染色技术。在这类方法中，将考马斯蓝溶于 TCA[21,22] 或过氯酸[23] 中，在这两种溶剂中，考马斯蓝是相当难溶的，结果形成的主要是染料-蛋白质复合物。因此染色迅速，着色深的蛋白质区带在数秒内显现出来，大约 45 分钟以后，着色最深，尽管某些工作者报道这类染色方法不如基于甲醇的染色和脱色法那样灵敏。本法的优点是迅速，而且 TCA 比醋酸固定效果更好，因此，若工作者怀疑染色时有蛋白质从凝胶上丢失，即可优先考虑这一方法。第 2 章中将更为详细地讨论。但是，大多数工作者仍继续用以甲醇为基础的考马斯蓝染色法，进行蛋白质区带的常规鉴定和定量。

考马斯蓝染色后的蛋白质定量：有许多专为扫描而设计的仪器和对凝胶扫描的标准分光光度计的附件。利用后一仪器，每条脱色的柱胶置于装有 7% 醋酸的浅玻璃槽中。也可以从板胶上将每一样品的电泳轨道切下，置于槽上进行扫描。这类仪器的大多数都是将凝胶以恒定的速度对一条垂直而又固定的细平行光束(550nm)进行移动，并通过光电管测定透射光，结果经分光光度计的输出记录在绘图纸上。令人遗憾的是，相当数量的这类仪器的光学性质不佳，以致用肉眼能清楚地辨别开来的区带，密度计常常不能清晰地绘出分离的峰（图 15)。某些密度计装有密度计记录的自动积分仪，它们将每一峰的峰下面积自动积分。用这一方法可以测定不同凝胶中某一成分的量，若缺乏自动积分仪设备，人们可以剪下记录纸上的峰并称重。此外，对于分离良好的染色区带，可将其切下，并浸渍在 25%(体积比)吡啶水溶液中室温下振荡过夜，以便洗出考马斯蓝[24]。吡啶使染料最大吸收值从 550nm 漂移至 605 nm。在 605nm 下将洗脱的染料定量，可以对区带中范围在 1—100 μg 的蛋白质定量。这一方法对双向凝胶电泳后斑点中的蛋白质定量特别有用(第 5 章)。

不同蛋白质结合考马斯蓝的数量不同，所以用染色方法定量测定某一蛋白质的含量需要制备该蛋白质的标准曲线。这一特点适合于扫描定量或洗脱定量。但是，若以其它蛋白质作标准，本法能测定多组分样本中某一特定蛋白质的相对含量，尽管仍然需要对所

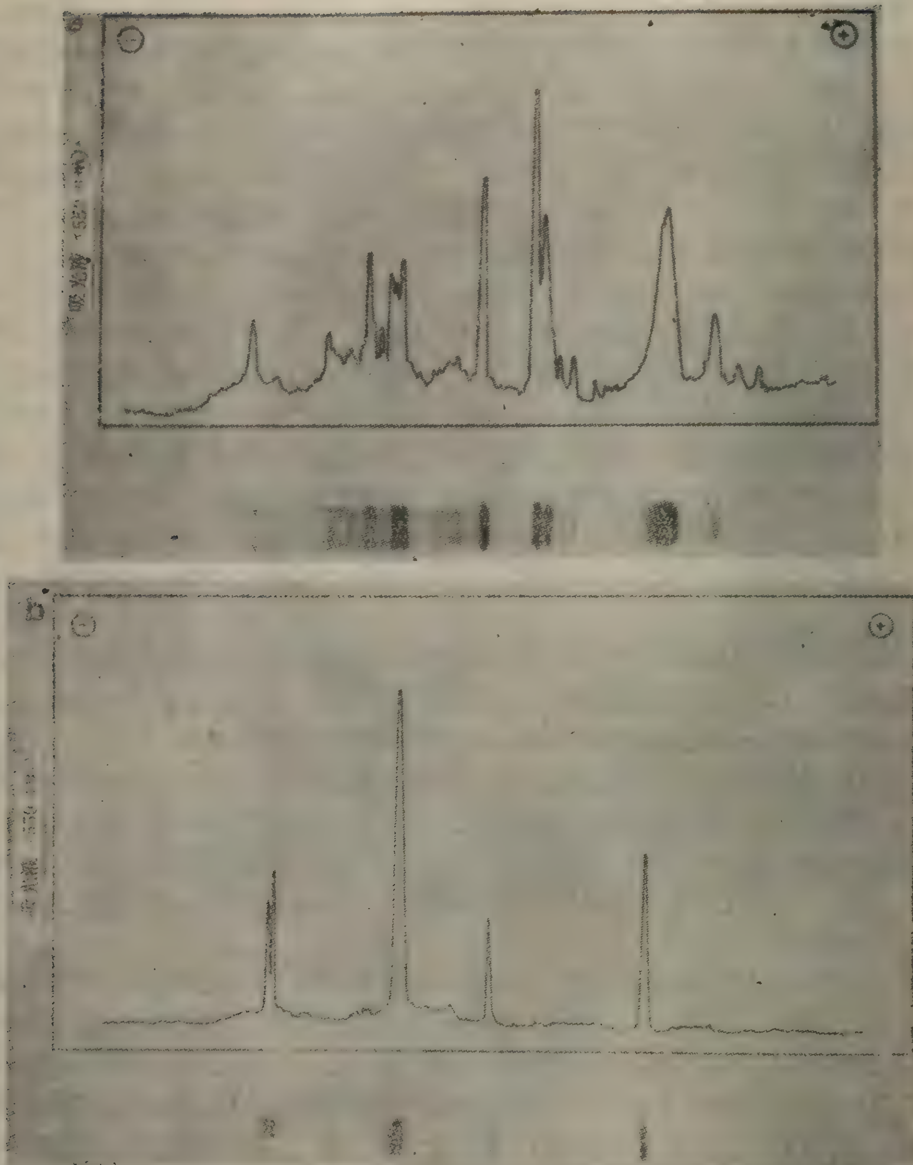


图15　考马斯蓝染蛋白质区带后的光密度分析。 a. 用麦胚凝集素沉淀获得的人胚盘膜亚组分（A. G. Booth 博士惠赠），在6—18%线性梯度浓度聚丙烯酰胺板胶上的分析结果。用考马斯蓝 R250 染色。图中展示了板胶电泳轨迹的照片，照片以上的图是这一电泳轨迹在550nm处的光密度扫描图。b. 几种分子量标志多肽（RNA 多聚酶 α、β、β' 亚基、牛血清白蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂），在6－18%聚丙烯酰胺线性梯度浓度的板胶上进行分析的电泳轨迹，其染色和扫描如a所述。

研究的蛋白质测定染料的吸收值与数量的线性关系。

蛋白质染色区带的摄影：为保存起见，柱胶可放置在密封管中，板胶放置在密封的塑料袋内，它们均含有7%的醋酸。在上述条件下，染色带几乎可以无限期地保持清晰可见。但是，以潮湿状态贮存的凝胶占据了大量的空间，并且容易丢失。保存板胶最好的方法是将它们拍照，再令其干燥（湿胶拍照的效果比干胶好）。照片和干胶都容易作标记说明和保存在记录本中。柱胶最好也用拍照方法记录电泳结果。沿纵向切成薄片后可将其

干燥[25]，但通常不这样做，因为干胶(放射自显影和荧光显影)应用的最好形式是板胶而不是柱胶。

湿柱胶或板胶的摄影是将其直接放在一个具有乳白色屏（避免捕获气泡）的光源上，在摄影过程中加入 7 %醋酸保持凝胶在湿润状态下。应使用细颗粒的全色胶片，例如 Ilford Pan F，红滤片将增加区带的反差。摄影时凝胶上加一个标题，以便日后鉴别样品。同样，应保证拍摄全凝胶，以便将来有必要作数据分析时，可从照片上计算蛋白质的 R_f 值。

凝胶的干燥：只有厚 1.5 mm 以下的板胶才能成功地进行干燥；较厚的凝胶干燥时常常龟裂，因此必须水平地切成薄片。已有能进行这一工作的仪器商品，但最好的方法是一开始即用薄的板胶进行电泳，这就避免了切片操作。

聚丙烯酰胺凝胶在干燥时若无任何支持物，它们将发生皱缩。但若放置在作垫的滤纸上干燥，凝胶的大小应与滤纸相同。有各种类型的凝胶干燥仪商品，它们适用于不同大小的凝胶，同时带有或不附带增加干燥速度的加热器。Bio-Rad 凝胶干燥仪（图 16）足以放置两块标准尺寸的板胶，还装有由定时计控制的加热器，故予以特别介绍。两块厚 1.5mm 的板胶用这种仪器干燥一般在 1 小时以内完成。若凝胶在干燥前先浸没在含 3 %甘油的溶液中过夜，可获得最佳效果。该溶液中应含有浓度足够高的异丙醇或甲醇，以防凝胶膨胀而超过其原来的大小，否则将发生龟裂。某些浓度梯度凝胶（如 6—18%丙烯酰胺），若首先浸入 30%甲醇-3%甘油的混合液中，也能成功地干燥，但更高浓度凝胶的干燥会遇到困难。将两张 3 MM 滤纸条放置在不锈钢托板上并用水浸湿。然后将板胶或柱胶切片排列其上，注意凝胶下不得压有气泡，在干燥时它可能引起龟裂。凝胶上再覆盖一张预先浸湿的玻璃纸，然后铺一张多孔塑料板，最后放上硅橡胶片(附在仪器上)，形成不漏气的密封。用一只良好的水泵或配备有冷指形水捕获器的真空泵提供真空，并打开加热器。干燥所需的确切时间取决于使用的凝胶大小及浓度。若凝胶在完全干燥前让空气进入组合物，那末凝胶势必发生龟裂。最后干燥的凝胶夹在滤纸垫和起防护作用的玻璃纸片之间。在干燥放射性凝胶时，以 Saran Wrap 粘膜（cling film）代替玻璃纸，以防污染多孔塑料板。

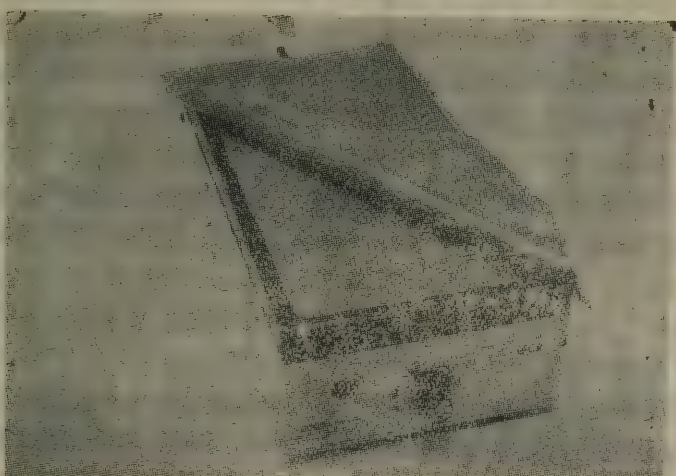


图 16 Bio-Rad 224 型凝胶干燥器。附着在仪器上的硅橡胶片已被卷起，露出在干燥时用于支托凝胶的不锈钢板。凝胶干燥时需要的有孔塑料薄板此处未显示。

曾介绍过某些能在实验室制造的凝胶干燥器,其中最简单的是 Maizel 的装置[26]。

银染色

最近报道了一种聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质高灵敏度银染色法[27]，据说比考马斯蓝灵敏 100 倍,显然可以检测 0.38ng/mm² 的牛血清白蛋白。银染色的相对密度与某些蛋白质(如磷酸化酶)的浓度大致呈线性关系，但对其它蛋白质(如牛血清白蛋白)在相同范围时却表现非线性关系。本法的广泛应用及可靠性尚待证明。最近已经报道[28]一种仍保持原方法灵敏度的简便方法。

荧光蛋白质标记

已设计出一种在电泳前用荧光分子将蛋白质共供偶联标记，于电泳后通过扫描来测定荧光区带的方法。虽然应用丹磺酰氯 (dansyl chloride) 的丹磺酰化是以这种方式标记蛋白质的最初方法，但最近的分析工作倾向于应用“荧光胺”{4- phenylspiro-[furan-2(3H)，1-phthalan]-3，3'-dione}，商品名称为 ‘Fluran’，由于它与丹磺酰氯不同，不论是游离的荧光胺还是水解产物均不发荧光，标记的蛋白质是唯一的荧光物质。这一试剂的主要优点是增加了检测的灵敏度(蛋白质一旦标记上荧光胺,即可检测到 1 ng 量的蛋白质),同时还能监视电泳分离过程，即简单地在暗室中用紫外线照射凝胶。荧光胺的不足之处是它与蛋白质反应时，将一个氨基转变成一个羧基，结果将改变蛋白质在不含 SDS 缓冲液中的泳动率。 事实上，已报道荧光胺改变某些蛋白质在 SDS-PAGE 中的泳动率[29]，虽然其它工作者利用相同的蛋白质发现它们仍然遵守通常的 R_f 与分子量的对数 ($\log_{10}$) 关系[30]。Barger 等[31] 介绍了另一种称之为 MDPF [2-methoxy-2，4-diphenyl-3(2H)-furanone] 的荧光标记物，其优点是在聚丙烯酰胺凝胶上 MDPF 标记蛋白质的荧光可保持数月,而荧光胺则在 24 小时后减弱。用 MDPF 标记时,荧光强度在蛋白质浓度 1—500ng 范围内呈线性关系,标记蛋白作 SDS-PAGE 分析时,其分子量的对数 ($\log_{10}$) 与 R_f 之间仍然呈线性关系。 有关荧光胺和 MDPF 的应用及扫描所需设备的详尽资料，在另一文献也作了介绍[32]。

可能是由于荧光蛋白质的定量需要特殊的扫描装置，在大多数情况下仍应用考马斯蓝,所以在电泳前预先用荧光分子标记蛋白质的技术,尚未在分析性聚丙烯酰胺凝胶电泳中广泛应用。

电泳后的蛋白质区带,也可以用荧光分子标记测定[33,34],但这类技术在分析性区带电泳中应用不普遍。

放射性蛋白质的检定

蛋白质可以在合成过程中利用标记氨基酸标记,或者在合成后通过碘化、还原性甲基化等方法进行放射性标记(附录 II)。放射性标记的主要优点是对凝胶电泳后的放射性标记蛋白质的检定,远比非标记蛋白质的染色法灵敏。有二种基本可行的方法。第一种是将凝胶紧靠 X 射线胶片,放射线使底片上的卤化银结晶产生银原子,将底片显影后可观察到它们(图 17a)。这种方法有某些重要变动以增加检测的灵敏度,但有时是为了保持底片影像吸光率和样品放射性之间的线性关系(见下文)。底片影象可以用摄影或用装备有扫描

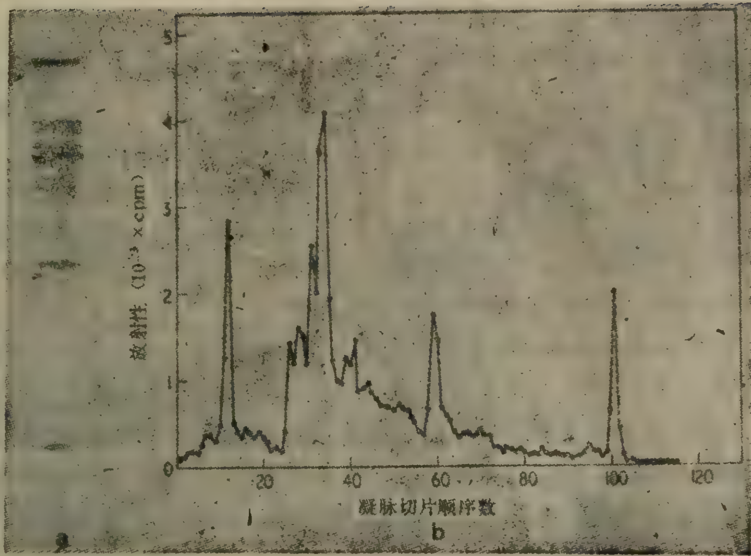


图 17 用(a)放射自显影法或（b）将凝胶切片，随后闪烁计数切片中的含量来测定放射性蛋白质区带。详尽的方法见正文。此处所显示的样品为［^{35}S］-甲硫氨酸标记的盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）孢子蛋白亚组分

附件的分光光度计测定光密度的方法来记录。后一方法也可以通过量度峰面积进行定量，尽管在扫描染色区带时相邻的区带分辨率不佳。第二种方法是电泳后将凝胶切片，并用闪烁计数测定每片切片中的放射性蛋白质含量（图 17 b）。这是最常用的定量方法，特别是在双标记实验中。但是，这个方法的分辨率取决于切片的大小，就凝胶的切片技术而言，通常不小于 0.5 mm。用 X 射线胶片对全胶进行检定能获得更高的分辨率。因此应当开始时就采用，特别是对较复杂的蛋白质混合物，以便鉴定样品中多肽的数量。

X 射线胶片的应用方法

由于曝光时间与应用的同位素种类、每一蛋白质区带的放射性强度以及研究者是希望只检测大组分或者是希望检测小的组分等有关，所以对于每一凝胶的最适曝光时间必须通过实验来测定。为了检测蛋白质混合物中的全部或绝大多数组分，可能需要用几种不同的曝光时间，因为长时间曝光可以检测较小的区带，但在长时间曝光过程中，大组分的摄影影象出现区带的扩展，结果区带变得不清楚还可能重叠。

直接放射性自显影：用粘膜(防止凝胶脱水和保持胶片湿润)密封板胶或柱胶切片于 X 射线胶片上，可以极容易地检定湿凝胶上的^{32}p 或^{125}I 标记的蛋白质。但是，若凝胶首先在一张 Whatman 3MM 滤纸上干燥，分辨率将大大提高。一般是将凝胶用考马斯蓝染色，并在干燥前脱色，以便放射自显影的影像可以与染色蛋白质区带的图象相比较。为了有利于染色的干凝胶和 X 射线胶片的影象易于排列比较，有益的方法是在自显影之前，在凝胶周边的滤纸上滴数滴放射性墨水（$\sim 1\mu c$ ^{14}C/ml 墨水)。这种墨水也用于标记凝胶(因而也是 X 射线胶片)以免后来发生差错。将用放射性墨水标记的染色干胶直接放置在 X 射线胶片上，夹在一个放射性显影的暗盒中，或用金属夹夹在玻璃板之间或硬质纤维板之间，然后包在一个黑塑料袋或放在不漏光的盒中。曝光(应放置在远离电离辐射外照

射源的地方)后,按照制造厂家的说明书将胶片显影。

用 Kodirex X 射线胶片直接对聚丙烯酰胺干凝胶进行放射性自显影，^{14}C (6,000dpm/cm^2)，^{35}S (6,000dpm/cm^2)，^{125}I (1,600dpm/cm^2) 和 ^{32}P (500dpm/cm^2) 曝光 24 小时，胶片上影象的吸光度即为 0.02 A_{540} 单位(恰在空白以上能观察到)[35,36]。胶片影象的吸光度与样品放射性成比例。遗憾的是，由于低能量的 β 粒子不能穿透凝胶基质，所以不能测 ^3H。但是，荧光显影(见下文)能测 ^3H，且能提高 ^{14}C 和 ^{35}S 用直接放射性自显影所能达到的灵敏度[35,37]。此外，Laskey 和 Mills[36] 对这一方法作了改进，称为“间接放射性自显影”，与直接放射性自显影法相比较，它明显地提高了对 ^{125}I 和 ^{32}P 的测定效率。Laskey 最近对荧光显影和间接放射性自显影的方法学进行了述评[38]。

^3H、^{14}C 和 ^{35}S 的荧光显影：在荧光显影中，凝胶浸入闪烁液 (2，5 diphenyloxazole; PPO) 中，干燥后置于 −70℃ 下令 X 射线胶片曝光。若在较高的温度下曝光，则方法灵敏度下降。虽然标记在蛋白质上的 ^3H 发射的低能量 β 粒子不能穿透凝胶基质和直接使 X 射线胶片曝光，但它们可以与凝胶中的 PPO 分子反应，将 β 粒子的能量转换成可见光，后者能使对蓝光敏感的 X 射线胶片感光。于是通过增加光的穿透性从而克服了样品和凝胶对 β 粒子的吸收问题。

荧光显影的基本操作参见表 7。它适用于未固定的凝胶及染色的凝胶。若将凝胶浸泡于二甲基亚砜 (DMSO)，因除去蛋白质区带中一些考马斯蓝使染色较弱的区带消失，另外凝胶中的 PPO 产生的沉淀使染色区带模糊。由于上述原因，在进行荧光显影之前，应当摄影记录已染色的凝胶。凝胶在干燥后和夹在 X 射线底片上之前，先用放射性墨水点在凝胶的周边作一标记，有助于凝胶上的荧光显影的影象与染色的区带进行比较。

遗憾的是，若用未经处理的 X 射线胶片，荧光影象的吸光度与样品中的放射性不成

表 7　荧光显影基本操作技术[a]

注意事项：整个操作过程应戴橡皮手套，以免皮肤接触 DMSO。

1. 电泳后或染色-脱色后，将凝胶浸于 20 倍体积的 DMSO 中 30 分钟，随后再用新的 DMSO[b] 溶液浸泡 30 分钟。上述 DMSO 可以分别贮存并用于处理其它凝胶 (按上述次序)。但不能长期使用，因为必须将水全部除去否则 PPO 不可能入胶。
2. 将凝胶浸于含 4 倍体积 20% (W/W) PPO 的 DMSO 溶液中 3 小时[c]。
3. 凝胶浸于 20 倍体积的水中 1 小时。PPO 能溶于 DMSO 中，但不能溶于水。因此，PPO 在凝胶基质中沉淀，将凝胶变成乳白色。
4. 真空干燥凝胶[d]。
5. 将凝胶放置在 X 射线胶片上并在 −70℃ 下曝光。Kodak X-Omat R、XR1 是最敏感的胶片，但在不能使用此胶片时，应当用敏感性稍次的 Fuji RX 胶片代替。参考文献[36] 列举了用于荧光显影中胶片的相对敏感性，放射自显影常用的 Kodirex 和 Kodak No-screen X 射线胶片，不能记录由荧光显影技术所产生的可见光，不能用于荧光显影。
6. 曝光后，在升温之前，先将胶片解开(以避免底片有形的模糊)并按照制造厂家的说明书显影。

a. 摘自参考文献 [35, 37]。

b. 若凝胶的丙烯酰胺少于 2%且含有 0.5%琼脂糖，可用甲醇代替 DMSO。电泳后，凝胶浸于 20 倍体积的甲醇中 30 分钟，随后在新的甲醇中浸泡 30 分钟。再将凝胶浸入 10% (重量/重量) PPO 甲醇中 3 小时。最后在不加热条件下真空干燥。

c. 加入 1 体积 PPO 的 DMSO 液体到 3 体积的 10% (体积/体积)乙醇中，可以从 DMSO 中回收过量的 PPO。10 分钟后过滤悬浮液，PPO 沉淀以 20 倍体积的水洗涤，然后空气干燥。

d. 若凝胶在干燥时龟裂，那末在第 3 步以后即凝胶干燥前，将凝胶浸于含 3%甘油的 30%甲醇溶液中，可以成功地将凝胶干燥。

正比，即少量的放射性产生不成比例的模糊影象。这一问题可以在胶片于放射性区带荧光显影检定之前，将胶片瞬间（≤1 毫秒）感光来克服[35]。控制 X 射线胶片预先感光的操作细节见表 8。若胶片预先曝光至吸光度在 0.1 和 0.2 A_{540} 单位，则荧光显影影象的吸光度与样品的放射性成正比，与直接的放射性自显影法比较，方法的敏感性仍然增加，可以测检 400dpm/cm² 的 ^{14}C 或 ^{35}S，或 8,000 dpm/cm² 的 ^{3}H（表 9）。应该指出，只有在胶片预先曝光的条件下，荧光显影图象吸光度的增量才能代表样品中放射性的真实分布。因此，预先将胶片曝光到吸光度为 0.15 A_{540} 单位，已常规地用于各种荧光显影定量的方法中。由

表 8　用于定量荧光显影的 X-射线胶片的预曝光[a]

利用电子闪光器(如 Vivitar 283) 的一次闪光来预曝光。闪光时间必须短促(≤1 毫秒)，因为较长时间的闪光只能增加底片本底的吸光度，并不增加胶片的敏感度。为了克服电容器充电时的细微差别，闪光器应在充电后至少发光 30 秒后才能使用。为了减少光的输出和漫射光源，在闪光器的窗上装三块滤片：

(i) 一块红外吸收滤片：放在紧靠闪光器的地方，以保护其它滤片免受所产生的热量损害。

(ii) 一块有色滤片：以减少光输出。深橙红色的 Kodak Wratten No. 22 适用于上述闪光器，而橙红色的 Kodak Wratten No. 21 适用于较弱的闪光器。

(iii) 疏松的纸(如 Whatman No.1 滤纸)：将灯泡的图象漫射开来，使胶片曝光均匀。

改变胶片和光源的距离(通常为 60—70 cm)，或暗箱孔径栏的直径大小，可以对发光强度进行微调节。预曝光用黄色纸作胶片的背景，凝胶放在胶片向光源的一面。用任一种常用的分光光度计测量预曝光胶片在 540 nm 处本底的吸光度，并与未曝光的胶片进行比较，以便判断预曝光的程度。预曝光胶片的保存不予介绍。

放射性蛋白质样品产生的图象的吸光度，可以用扫描分光光度计在 540nm 处扫描定量。胶片影象吸光度与放射性强度之间的线性关系，以及试验中所应用的范围，应当用液体闪烁测量方法，通过测定有关凝胶切片的实际放射性，对每批胶片进行检查。

将 X 射线胶片的预曝光增加到 0.2 A_{540} 单位以上，虽然荧光显影对 ^{3}H、^{14}C 和 ^{35}S 检测的敏感度有所增加，但影象的吸光度不再与样品中的放射性成比例[35]。

最近， Chamberlain[39] 介绍在荧光显影中，用水杨酸钠作荧光体来代替 PPO。水杨酸盐优于 PPO 的特点之一是它的价格低廉。另一主要优点是水杨酸盐是水溶性的，因此以水杨酸盐作荧光体进行荧光显影，就避免了凝胶长时间在 DMSO 中平衡及随后的用水洗涤；一般需平衡 0.5—1 小时，而不是在 DMSO-PPO 系统中需平衡 5 小时。根据目前已出版的资料，用水杨酸盐及预曝光的 X 射线胶片作荧光显影，其敏感性与 DMSO-PPO 系统相同，荧光显影影象的吸光度与样品放射性之间存在着相似的线性关系[39]。唯一不足的是与 PPO 比较，用水杨酸盐作荧光体其胶片影象有轻微扩散。

^{32}P 或 ^{125}I 的间接放射性自显影：该方法是将凝胶(未作其它处理的湿胶或干胶，染色的或未染色的凝胶)放在一张预先曝光的 X 射线胶片上，于胶片的另一侧放一张钨酸钙 X 射线增感屏，再将整个夹层放于 −70℃ 下让胶片曝光[36]。样品中发射的放射线穿过胶片，产生通常所说的直接放射性自显影影象，但增感屏能更有效地吸收完全穿过胶片的射线，并产生多个光子，这些光子又返回胶片，结果在放射性自显影的影象上又叠加一层光摄影的影象。由上述方法所获得的分辨力略低于直接放射性自显影法，但灵敏性显著增加。利用预先曝光至 0.15 A_{540} 单位的 Kodak X- Omat R 胶片和一张 Fuji Mach II，或 Dupont Cronex Lightning Plus 增感屏，与直接放射性自显影法比较，对 ^{32}P 的检测效率提高 10.5 倍，对 ^{125}I 则提高 16 倍，因而约 100dpm 的 ^{125}I/cm² 或 50dpm 的 ^{32}P/cm² 即可使胶片

表 9 聚丙烯酰胺凝胶中放射性同位素检测方法的灵敏度^{a}

同位素	方法	24 小时中为获得可检定的影象 ($A_{540}=0.02$) 所需要的dpm/cm²	比直接放射性自显影法提高的倍数
^{125}I	间接放射性自显影	~100	16
^{32}P	间接放射性自显影	50	10.5
^{14}C	荧光显影	400	15
^{35}S	荧光显影	400	15
^{3}H	荧光显影	8,000	>1000

a. 经允许引自参考文献 [38]。数据系于 −70℃ 下预先将胶片曝光,其吸光度 ($A_{540}=0.15$) 在未曝光胶片本底的吸光度之上。作比较用的直接放射性自显影是 Kodirex 胶片。

感光变黑(表 9)。胶片影象的密度仍与样品的放射性成比例,因而可用于定量研究。象在荧光显影中一样,将胶片预曝光至 0.2 A_{540} 单位以上,仍然可以增加测定效率,但是胶片影象和放射性之间不再呈线性关系。

X 射线胶片对间接放射性自显影的适应性,与荧光显影中测定光子的情况相同(表 7)。钨酸钙增感屏(可以反复使用)的来源也是重要的,Fuji Mach II 或 Dupont Lightning Plus 增感屏对间接放射性自显影效果最佳。参考文献 [36] 列举了其它增感屏的性能。

用 X 射线胶片测定双标记同素:McConkey[40] 讨论了用 X 射线胶片进行双标记同位素研究的途径,还叙述了用于这一目的的方法。将用来制备荧光显影的凝胶,对 X-射线胶片曝光,该胶片对产生的光闪烁敏感,因而既测 ^{14}C 又测 ^{3}H (见前述)。然后将凝胶放置在 Kodak No-Screen X 射线胶片上,该胶片对荧光不敏感,故通过直接放射性自显影仅测定 ^{14}C。比较二种胶片上产生的影象,人们得以鉴别二种或其中任意一种同位素标记的蛋白质。

Walton 等[41]也发表了一种类似的方法。先作荧光显影的凝胶,对敏感的 X 射线胶片曝光,因而既测 ^{14}C 又测 ^{3}H。然后用不褪色的墨水将凝胶涂黑,并对另一张胶片作直接放射性自显影。若 $^{3}H/^{14}C$ 比值超过 40:1,由于黑墨水阻止 ^{3}H 发射的光子达到胶片,所以 ^{3}H 几乎全部在荧光显影中测出,而直接放射性自显影显示的仅为 ^{14}C。最后建立的另一种方法是使用彩色负片[42]。它由三种感光乳胶组成,每种乳胶对三种加和的原色(红、绿和蓝)之一灵敏。由于多层胶片曝光需要通过不同厚度的乳胶,因此不同能量的射线穿入不同的深度,结果三层中的曝光率不同,最终产生不同的颜色。

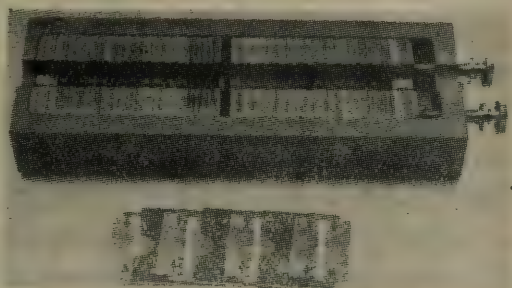
将凝胶分段和计数的方法

聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将凝胶分段并对各段凝胶溶解行闪烁计数,这是标记蛋白质组分定量应用最广泛的方法。其原因之一是现代闪烁光谱仪能区分不同能量的射线,因而能对不同同位素标记的样品进行定量(而不只是检出)。

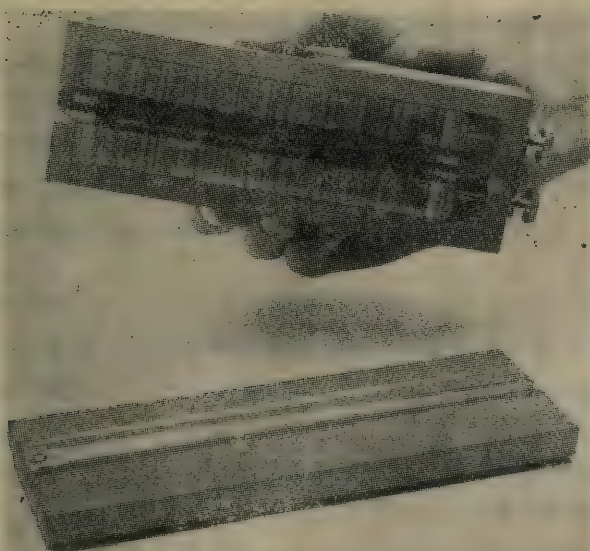
分段方法:在滤纸上已干燥的板胶或柱胶可用剪刀剪成小片,由于难以获得宽度均一的小块,所以是不精确的,因此,通常当凝胶仍在潮湿状态时即切片。然而,若工作者希望对单个区带进行定量,或测量经放射性自显影或荧光显影测定双标记区带同位素的比例时,用干凝胶切片仍然是有利的。若用于放射性自显影或荧光显影的凝胶未经染色,可以将放射性自显影拍照(作为永久性记录)给区带定位,然后将有关的区带影象从胶片上剪下。将胶片放置在未染色的凝胶上,作为模板以标志出放射性区带的位置,并从凝胶上

切下放射性区带。简单地加常规的闪烁液于干凝胶切片中，即能有效地对含 ^{32}P 或 ^{125}I 的凝胶切片计数。从用 PPO 进行荧光显影的凝胶上切下含 ^{14}C、^{35}S 或 ^{3}H 的凝胶切片，也能以相同的方法计数而不必将凝胶水解。事实上，Laskey[38] 已注意到，在后一种情况下，不需要在计数前加入闪烁剂，因为凝胶切片已含有 PPO。必要时，干胶切片可以直接按下文叙述的方法水解，或者是干胶切片再水化时凝胶中的放射性蛋白质泄漏出来，因而可进行放射性测量。

有许多用于湿聚丙烯酰胺凝胶的切片装置(见参考文献 [43])，其中只有部分装置同时适用于柱胶和板胶。采用 Mickle 凝胶切片器 (Joyce Loebl) 时，柱胶或板胶的泳动轨迹片段固定在一个滑动轮的架板上，该滑动轮架板有节奏地以恒定的小距离通过一把闸刀。对于大多数聚丙烯酰胺凝胶，最小的适用切片其大小约为 0.5 mm。操作时手工移去切片。然而，最简单、应用最广泛的一种切片装置，是由一系列刀片用铝、不锈钢或塑料垫



(a)



(b)

图 18　一种手工操作的凝胶切片器 (Bio-Rad model 190)。(a) 凝胶切片器由一系列刀片构成，刀片之间由 0.1 cm 厚的金属垫片隔开。图中取出四片刀片和三片垫片，并展示在凝胶切片器的前面。(b) 待切的凝胶保持在塑料管构成的槽中，如图所示。

片隔开而形成，实验室工作间很容易制成一种适用的装置，但是某些型号的商品制成的切片更均一(如 Bio-Rad Laboratories Ltd.; 图 18)。

由于柱胶在低浓度时呈粘稠状，而在高浓度时又似橡胶，它们都难以切片，故需要冰

冻以利于切片。冰冻凝胶的温度是重要的，因为若凝胶温度过低，它很难切片而且在切片时容易碎裂。最容易的方法是将凝胶置于 −70℃ 下约 1 小时。此外，可以将凝胶置于铝箔槽中并放置在干冰上，使凝胶恰好冰冻。冰冻时凝胶应保持直线状态，将冰冻的凝胶放在一张塑料板上，或放在一条用塑料管切成的槽中（图 18），切片刀沿凝胶的长轴方向排列。然后用力压下切片刀，同时在与凝胶垂直的方向上来回摇动，以便刀片进入凝胶。用一支注射器针头，一把解剖刀或一把细镊子，将凝胶切片从刀片间转移至计数杯中。然后在自来水下洗涤刀片，甩去过量的水，在已经反复使用的滤纸垫上吸干。若切片时凝胶碎裂严重，则应在切片前将凝胶稍融。若在聚合前于凝胶混合液中加入 10% 甘油，也能防止凝胶碎裂。

板胶先按单个的泳动轨迹切割分开。切割时用解剖刀常造成凝胶撕裂。更好的方法是用一把刀口锋利而又平的长刀，沿泳动轨迹的延伸方向一次切下凝胶。用柱胶切片器（见上文）可以将板胶的泳动轨迹横向切片，但通常不需冰冻，可能是由于凝胶的厚度（0.75—1.5 mm）关系。

计数方法：液体闪烁计数是同位素定量的首选方法。为了获得最高的计数效率，需要将蛋白质从凝胶切片中洗脱下来。有二种方法可供选用。一是将凝胶溶解，另一种方法是使凝胶膨胀并将蛋白质滤出。

双丙烯酰胺交联的聚丙烯酰胺凝胶，可以用过氧化氢加热溶解。

(i) 将切片（1 mm）置闪烁杯中，在室温下过夜或在 50℃ 下经 2 小时干燥。

(ii) 每杯中加入 0.25 ml 30%（重量/体积）H_2O_2，盖紧杯盖将杯倾斜，令切片浸于液体，50℃ 保温使凝胶溶解。

(iii) 开盖前将杯冷至室温。然后每杯加入 5 ml 或 10 ml 易与水混悬的闪烁液，闪烁液系由 NCS（Amersham-Searle）和甲苯闪烁液（5.0 g PPO，0.5gPOPOP 溶于 1 l 甲苯）以 1:5 体积比混合而成。一种价格较低的闪烁液是 Triton X-100：甲苯闪烁液（1 体积 Triton X-100:2 体积甲苯闪烁液）。在这种情况下，凝胶切片溶于 0.5 ml 30%（重量/体积）H_2O_2，然后加入 4.5 ml Triton X-100：甲苯闪烁液。二种方法均产生完全透明的计数混合液。

虽然用这种方法 ^{14}C 以 $^{14}CO_2$ 的形式损失的量不足 5%，但 Goodman 等[44] 用碱性过氧化物捕获 $^{14}CO_2$ 的改进方法无 CO_2 逸出。除试剂中加 1 体积的浓 NH_4OH（比重 0.88）至 99 体积 30%（重量/体积），并预先冷至 4℃ 的 H_2O_2 外，其操作步骤与上述方法相同。混合物置于冰上并立即使用。最初应用的保温温度是 37℃，但 50℃ 也是常用的温度。尽管 NCS-甲苯闪烁液可以制备出透明的计数混合液，但是用 Triton X-100：甲苯闪烁液制备的计数混合液略带雾状。化学发光有时是一个问题。这时的计数杯应间隔 24 小时计数 2 次，或者直到获得稳定的计数值为止。因化学发光所产生的计数一般在 48 小时内衰减至本底水平。

溶解凝胶的另一种方法是利用对化学水解更敏感的交联剂代替双丙烯酰胺。有许多这类不稳定的交联剂可供利用。乙烯二丙烯酸酯（ethylene diacrylate）具有一个酯键而不是双丙烯酰胺的酰胺键，因此乙烯二丙烯酸酯交联的凝胶可以用碱溶解[45]。可惜，由于这种对碱的不稳定性，使乙烯二丙烯酸酯不适用于数量众多的 pH 偏高条件下的蛋白质电泳。N，N'-双丙烯酰胱胺（BAC，N，N'-bisacrylylcystamine）是一种含二硫键的双丙烯酰

胺类似物，应用这种交联剂使得聚丙烯酰胺凝胶可以溶于 2-巯基乙醇中（详细内容见参考文献[46]）。显然，这种对巯基试剂敏感的性质，限制 BAC 应用在不含巯基的蛋白电泳中。最常用的不稳定交联剂是 N，N'-二烯丙基酒石酸二酰胺（N，N'-diallyltartardiamide，DATD），它含有易被高碘酸氧化的 1，2-二醇（1，2-diol）结构。然而，分子当量数相等的 DATD 取代双丙烯酰胺后生成的凝胶，其物理强度降低。通过增加交联剂的比例，凝胶强度偏低的性质可以得到纠正。某些工作者应用丙烯酰胺：DATD（30:3）代替丙烯酰胺：双丙烯酰胺（30:0.8），但 Spath 和 Koblet[47] 发现需要将 DATD 的量增加到 27%，凝胶才与含 5% 双丙烯酰胺的凝胶具有相似的物理性质（交联剂百分数系以单体总量的百分数表示）。此外，DATD 交联的凝胶比用 2.6% 或 5% 双丙烯酰胺交联的凝胶具有更大的孔径，因此蛋白质比在各种浓度的丙烯酰胺凝胶中泳动更迅速。这点可通过增加丙烯酰胺凝胶的浓度来补偿。

DATD 交联凝胶的溶解是向凝胶中加入 0.5 ml 2%（重量/体积）过碘酸，并在室温下经历 1—2 小时。凝胶溶解后剧烈混合以便凝胶分散开来，然后加入与水混悬的闪烁液并对样品计数。Anderson 和 McClure[48] 发现，加入 5 ml 0.3%（重量/体积）PPO，25%（重量/体积）Triton X-114 的二甲苯溶液，对这一应用特别适用，对 ^{3}H 和 ^{14}C 计数效率高，分别达到 47% 和 93%。也可应用其它与水混悬的闪烁液。

为了提高闪烁计数效率，从凝胶中滤取蛋白质的另一方法可以按照几种方案进行。在原始的操作中，是将每片凝胶在 65℃ 下浸于 0.5 ml NCS 经 2 小时使其膨胀，然后加入 10ml 甲苯闪烁液[49]。除非将 NCS 稀释（NCS：水＝9:1），否则高浓度的聚丙烯酰胺凝胶不发生膨胀。这类方法中的另一种是在计数前向每片凝胶加 10 ml 闪烁液（14.0 g PPO，0.21g POPOP，143ml NCS，3.75 l 甲苯），并在 37℃ 下保温过夜[50]。最近，Aloyo[51] 建议将 10 ml 闪烁液（每升甲苯中含 6.0 g PPO，10 ml NCS，10 ml hyamine hydroxide）直接加至 1mm 厚的湿凝胶切片中，简单地振摇，室温下经 48 小时后测量其放射性。本法的产率及计数效率优于碱性过氧化物溶解法。最后，New England Nuclear（NEN）出售一种已经混合的闪烁液，用来从凝胶切片中滤取标记的蛋白质。

蛋白质比放射性的测定

Martin 等[52] 叙述了一种从聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的蛋白质中，测定亮氨酸比放射性的方法。蛋白质在 HCl 中水解并测定放射性，同时利用氨酰基合成酶（amino-acyl synthetase）测定亮氨酸的含量。一种更新的利用放射性标记丹磺酰氯[53] 的方法，使操作者能对经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的任一蛋白质的数种氨基酸的比放射性或氨基酸含量进行测定。

糖蛋白及磷蛋白的测定

糖蛋白易于在聚丙烯酰胺凝胶上定位，也容易和其它非糖基化的蛋白质区别开来。过去，最常用的测定方法是过碘酸-Schiff（PAS）染色法，但近来出现了某些其它有用的方法，其中包括在电泳前选择性地用放射性标记糖（在体内用糖的前体标记或在体外标记），然后在电泳后，利用放射性标记的荧光的或与过氧化物酶偶联的外源凝集素，经荧光显影或放射自显影对糖蛋白进行测定。上述及其它糖蛋白的检测方法参见附录 I。

按照附录 I 几种方法中的任何一种都可以测定磷蛋白，但最灵敏的方法是在体内用 ^{32}P 标记蛋白质，经凝胶电泳后用放射性自显影来检测磷蛋白。脂类和核酸也可被标记，因此在电泳前应从样品中将它们除去。另一种方法是电泳后进行酸水解能除去标记的核酸[54]；必要时，蛋白质首先用考马斯蓝染色，然后凝胶在 7% TCA 中平衡过夜，随后在 7% TCA 中于 90℃ 水解 30 分钟。在 24 小时期间于室温下将凝胶浸在 7% TCA 中并数次更换溶液，可除去标记的核苷酸。在此期间凝胶在往复式振荡器上温和地振摇。若凝胶在酸水解前已染色，则应按常规脱色，干燥并进行放射性自显影。标记脂类随缓冲液前沿移动，其中大部分在染色和脱色步骤中被抽提除去。

应用免疫学方法检测蛋白质

若能得到特异性专一的抗体，即使是在 SDS 存在的条件下进行电泳，电泳后也常常可以检测出特定的蛋白质。已设计几种方法来测定特异的蛋白质。例如将洗涤过的凝胶与专一的抗体保温，随后再与偶联辣根过氧化物酶的抗-IgG 保温，即可观察到抗原[55]。进一步再与 3，3'-二氨基联苯胺和过氧化氢保温后，则形成抗原-抗体-抗体-过氧化物酶复合物，以清晰的染色区带的形式出现。另一种方法是将凝胶与放射性抗体相接触后，进行放射性自显影，也能检测抗原。双抗体法是可取的，它将放射性标记在与第一抗体起直接反应的第二抗体上，或者用 ^{125}I 标记金黄色葡萄球菌蛋白 A（*Staphylococcus aureus* Protein A，它与 IgG 的 Fc 端结合）以代替第二抗体[56]。为了获得良好的信息/本底的比值，需要细心地洗涤。一种有前途的改进是首先将蛋白质转移到重氮化苄甲氧基滤纸（diazobenzyloxymethyl paper）上，使其共价偶联[57]。在依次与未标记的抗体及 ^{125}I 标记的金黄色葡萄球菌蛋白 A 保温后，用放射性自显影来检定特异抗原。抗体和蛋白 A 能用尿素和 2-巯基乙醇除去，滤纸再用于研究特异性不同的抗体。

另一种方法是切下凝胶条，并用交叉免疫电泳检定特异性抗原，在交叉免疫电泳过程中，抗原从聚丙烯酰胺凝胶中电泳迁移至含抗体的琼脂糖凝胶上，并产生特异性的抗原-抗体沉淀反应[58]。已报道一种更简便的方法，即将含抗体的琼脂糖直接铺在电泳后的聚丙烯酰胺板凝胶的表面。蛋白质抗原从聚丙烯酰胺凝胶中扩散出来，并与琼脂糖凝胶中的抗体反应产生称之为“免疫拷贝”（immunoreplica）的免疫沉淀图象，此图象可用染色或用 ^{125}I 标记的蛋白质 A 显示出来[59,60]。这类方法中的其它几种可参见附录 I。

酶的检测

凝胶切片后再通过扩散洗脱使样品洗至适当的缓冲液中，可对酶进行测定。然而，这种操作方法对于大批样品是耗费精力的，而且若两种酶的泳动率差别不大则可能被忽略。另一种方法是在原位对特异酶染色。这一方法的主要限制是只能对数量不多的几种酶进行测定，其次是结果不易定量。因此，它主要用于板凝胶电泳后的大量样品中对某一特殊的酶进行分析比较，或者在制备性的工作中对酶定位，其它蛋白质虽未观察到，但可能以杂质的形式存在于制剂中。

通过在四唑盐（tetrazolium salt）的溶液中保温凝胶，可对脱氢酶定位，四唑盐在反应中作为最终的电子受体被还原后，产生有色的甲臜（formazan）。硝基蓝四唑（nitroblue tetrazolium，NBT）和甲基噻唑四唑（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）已广泛用来测

定脱氢酶，虽然也能利用其它适宜的四唑盐。有时用吩嗪甲硫酸盐（phenazine methosulphate，PMS）作为还原辅酶或酶辅基和四唑盐之间的氢离子（hydride-ion carrier）载体。由于四唑盐是光敏性的，保温必须在黑暗中进行。有时候不含脱氢酶也观察到着色带[61]，因此必须作对照以保证研究的只是酶反应。利用在酶反应中生成有色的色原物质或产生荧光的荧光原物质作底物，极易测定水解酶。转移酶和异构酶不适应这种方法，通常需要将酶在具有脱氢酶偶联反应的混和体系中进行测定，在混合体系中酶反应将生成某种产物，它能被混合体系中的脱氢酶作用。按上述方法定位的是脱氢酶的产物，但定位的确是转移酶或异构酶。由于偶联酶在聚丙烯酰胺凝胶中的渗透性不佳，因此有色产物仅在凝胶的表面形成。将包含有偶联酶在内的检定混合物即指示胶（常为琼脂糖）铺在聚丙烯酰胺凝胶的表面上，并令凝胶彼此接触，可减少区带的扩散及试剂的体积。若采用这种方法，应加一滴样品到指示胶上作为阳性对照，以保证偶联酶在琼脂糖处理过程中仍保存活性。

各种酶的检测方法参见附录 I。

分离蛋白质的回收

制备大量的某一蛋白质最好选用第 2 章所介绍的特殊的聚丙烯酰胺凝胶电泳仪，该仪器在蛋白质区带从大的柱胶底部洗脱下蛋白质时，即可收集蛋白质区带。然而，毫克数量以下的数种蛋白质的分离，可以从柱胶或改进的板胶上切下各个样品带来获得。用板胶分离时，凝胶不是制成各别的样品池，而是用缓冲液覆盖在凝胶的混合液上，形成一连续平坦的弯月面，或者用一个“齿”长与凝胶宽度相近的样品梳制成一个样品池。聚合后，加样品于凝胶上，在凝胶的整个上部边缘形成一连续的样品层。在通常的板凝胶上，用不连续缓冲系统可加 2.0 ml 含数毫克的蛋白质样品。用较厚的侧垫片制成较厚的板凝胶也能增加凝胶的样品容量。电泳后，蛋白质即分离成横向穿过凝胶的区带。

蛋白质区带的定位

一旦电泳完成，在切下蛋白质区带之前须先定位。一般说来，从固定、染色的凝胶区带中获得的蛋白质产率，比未固定的凝胶少得多，因此后来设计了几种蛋白质定位的方法。

(i) 将凝胶切成片，借扩散作用用合适的缓冲液对每片凝胶进行洗脱，然后分析有关蛋白质。天然蛋白质的分析是根据蛋白质的生物活性（如酶）。用 SDS-PAGE 分离已变性的有关蛋白质，也能在 37℃ 下过夜洗脱到 0.01 mol/L NH_4HCO_3，0.05% SDS 的溶液中，随后冰冻干燥，然后取每分洗脱液的一部分，在一块分析性板凝胶上分别上样电泳，并按常规方法染色和脱色来定位。

(ii) 另一方法是从板凝胶的两边纵向切下两条胶，同时从板凝胶的中央纵向切下一窄条凝胶，用考马斯蓝将三条凝胶条染色，而玻璃板上其余凝胶用薄膜覆盖贴紧，置冰箱中保存。然后，将染色的凝胶条与未染色的凝胶排成一线（不要相互接触），根据染色凝胶的蛋白区带位置，从未染色的凝胶上切下有关蛋白质的区带。用柱胶代替板凝胶可将一条柱胶染色和脱色，并以蛋白质的 R_f 作为依据，从其它相同的但未经染色的柱胶上切下

蛋白区带。然而，本方法通常用于板凝胶而不用于柱胶，因为在板凝胶上可以获得更均一的迁移率。若用板凝胶使待回收的区带与可能存在的杂质很好分离，本法可以获得良好的结果。

(iii) 将整个不含 SDS 的未染色的凝胶浸于 pH6.8、含 0.003%(重量/体积) 1-苯胺基-8-萘磺酸盐 (1-anilino-8- naphthalene sulphonate, ANS) 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中，可以检测出凝胶上的蛋白质区带[33]。用紫外灯照射时，在 5—10 分钟内荧光蛋白区带即显现出来。通常可观察到含 20μg 蛋白质的区带。本法优于凝胶边沿切条染色的方法，在上述第 ii 条中，当样品体积大于数毫升时则不能分成区带。本法的另一改进是，为了减少在大孔径凝胶中的扩散作用，将 ANS 溶解于 75% 饱和硫酸铵溶液中。

(iv) 对 SDS-PAGE 分离后的多肽定位，日渐普及和十分灵敏的方法是首先将大量的样品与一分已与丹磺酰氯反应的样品多肽混合。电泳时，丹磺酰化的多肽与其未经修饰的多肽完全一致地同步泳动，电泳后，作为标志物在紫外灯下观察凝胶[62,63]。由于丹磺酰化反应改变了多肽的电荷量，这一方法通常仅适用于含 SDS 的电泳中，这是由于 SDS 屏避了丹磺酰化反应所引起的电荷量的微小变化。本法的另一优点是，人们只需要将凝胶简单地在紫外灯下照射观察，即可了解在电泳或扩散洗脱期间多肽从凝胶上回收的过程。

(v) 也可以借助酪氨酸和色氨酸在紫外线照射下产生的磷光对未染色凝胶上的蛋白质定位[64]，但这种方法很少应用。

(vi) 许多其它在 SDS-PAGE 后不用染料对多肽定位的方法，如在 0—4℃ 下将凝胶冷却产生沉淀，或与钾离子或阳离子表面活性剂保温生成沉淀来观察 SDS-多肽复合物，但目前应用极少。有关这些和其它“直接检测”的方法参见附录 I。

(vii) 将凝胶与适当的反应混合物保温 (附录 I)，可以在原位对某些酶定位。酶活性通常是在颜色或荧光强弱上发生某些变化，根据这些变化对酶定位。由于只能观察到特异酶，因此切下的区带很可能有其它蛋白质污染，特别是由于有色的或荧光的反应产物易于扩散而形成宽带。

(viii) 最后，可以用考马斯蓝染色观察蛋白质带。由于染色条件会导致天然蛋白质失活，因此这种方法只适用于在随后的分析中与活性无关的蛋白质。染色和脱色时间应尽可能短，以便既能观察到区带又能使染色剂和固定剂渗入凝胶的数量减少。染色的凝胶用水漂洗以除去过量的固定剂，然后切下有关蛋白质区带。这种蛋白质定位和洗脱方法是 Cleveland 肽图法的基础(见第 6 章)。

蛋白质的洗脱

若凝胶分级分离的目的是纯化足够数量的蛋白质以制备抗体，那末由于聚丙烯酰胺凝胶不干扰抗体的产生，因此通常不需要将蛋白质与其分离开来。将凝胶切片简单地与弗氏佐剂 (Freund's adjuvant) 匀浆，并直接注射(见第 7 章)。由 SDS-多肽复合物激活的抗体，常常既能沉淀天然蛋白质又能沉淀变性多肽。

出于其它目的，通常需要将蛋白质与凝胶基质分离开来。理论上，最简便的方法可能是溶解凝胶，然而，不仅这些溶解试剂对蛋白质极其有害，而且凝胶的交联也是不稳定的，结果使蛋白质受聚丙烯酰胺长链分子的污染。目前尚无适用的方法可简便和定量地除去这类污染物。

两种常用的回收蛋白质的方法是扩散和电泳洗脱。电泳洗脱的主要优点是迅速，同时洗脱蛋白质的体积一般比扩散洗脱小得多。扩散洗脱较简单，但蛋白质的回收，特别是在缺乏 SDS 存在的情况下可能欠佳。

扩散洗脱

用解剖刀或匀浆器将凝胶切片细细捣碎和浸泡。这种操作增加了凝胶的表面积，若加入适宜的缓冲液，则洗脱容易进行。遗憾的是，一方面为了减少洗脱后的回收问题需要保持尽可能小的体积，另一方面为了获得良好的产率又需要应用体积足够大的缓冲液，这两者之间存在着矛盾。用相当于凝胶 3 倍体积的缓冲液与凝胶混合过夜，例如将样品放置在处于垂直旋转盘上有塞的硅烷化试管中，于次日又重复抽提是一种合理的方法。若蛋白质在较高的温度下稳定，可采用较高的温度以加速洗脱过程。例如，SDS-多肽复合物能在 37℃ 下过夜洗脱到含 0.05% SDS 的缓冲液中。扩散洗脱蛋白质的回收程度随天然蛋白质的不同而变化极大，但是若洗脱缓冲液中含 0.05—0.1% SDS，则回收可达到 70%。在各种情况下的凝胶碎片可简单地离心除去。用尿素或盐酸胍可以除去 SDS [见后文均一性和同一性中的第 (iv) 节]。

电泳洗脱

已设计出一些从聚丙烯酰胺凝胶切片中电泳洗脱蛋白质的装置，大多数装置靠电泳将蛋白质从凝胶中移出而进入一个小室中，小室通过一层透析膜与贮液槽缓冲液相接触。蛋白质洗脱后，保留在洗脱的小室中。这类装置从需要熟练的精巧工艺制造[65] 直到常规柱胶的简单接收[62,66]，而某些装置已商品化(如 ISCO)。第 3 章也叙述了某些适用的仪器及其应用方法。

基本技术的改进

寡肽的分子量分析

分子量低于 10,000 左右的寡肽，即便用 15% 聚丙烯酰胺凝胶的 SDS-PAGE 也不能完全分离(图 6)。然而，利用高比值双丙烯酰胺交联剂/丙烯酰胺(1:10)制备的 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶，在含有 SDS 及 8 mol/L 尿素的缓冲液中，寡肽的分离得到明显改善[67]。在这种条件下，某些蛋白质(如细胞色素 c 和肌红蛋白)的溴化氰裂解产物电泳时，其寡肽分子量的对数 ($\log_{10}$) 与分子量为 2,500-17,000 片段的泳动率之间呈良好的线性关系 (图 19)。可惜的是，天然小肽常不遵循线性关系，据认为这是由于在这种状况下，小肽的固有电荷及其构象对泳动率有更大的影响。因此用这种方法测定各种寡肽的分子量仅属近似值。详尽的方法参见表 10。

特殊蛋白质的分离

本章前述的电泳方法虽然能分离众多的细胞蛋白质，但某些特殊的蛋白质在常用的缓冲液中不易溶解，因此它们的分级分离需要特殊的电泳系统。这些分离方法叙述如下。

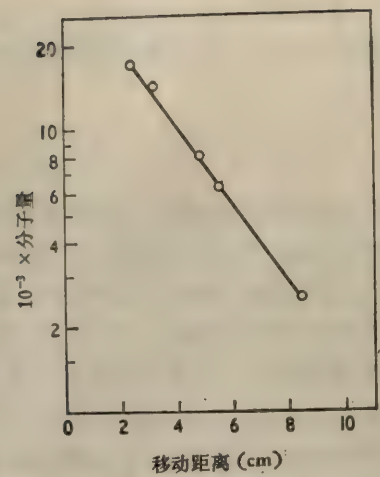


图 19 根据 Swank 和 Munkers 方法，寡肽在 SDS-尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳上的泳动率[67]。电泳按表 10 所述的方法在板凝胶上进行。寡肽按分子量递减的顺序是：马心肌红蛋白（分子量16,950）、马心肌红蛋白溴化氰裂解片段 I + II(14,404)、I(8,159)、II(6,214) 和 III(2,512)。马心肌红蛋白及其溴化氰裂解片段的分子量系从参考文献 [129] 所述的序列数据中计算获得。

组蛋白

组蛋白是一类小的、强碱性蛋白质。大多数场合下可分成五大类：H1、H2A、H2B、H3 和 H4，通过乙酰化、磷酸化以及 ADP-核糖基化作用所产生的电荷变化，可出现某些变异类型。有关这类蛋白质电泳分析的主要问题，是在变性剂缺乏的条件下组蛋白不溶解。用 SDS 作变性剂，这类蛋白质可以用 SDS-PAGE 分析，这时蛋白质的分级分离主要依据分子的大小；因此，SDS-PAGE 对组蛋白分子大小的分级分离是有用的，但不能分析具有不同电荷的组蛋白类型。既与分子大小又与电荷量有关的聚丙烯酰胺凝胶电泳的分级分离，需要应用的变性剂既能防止组蛋白凝聚，又能保持不同蛋白质之间的电荷差别。达到这一目的的有效方法是利用醋酸-尿素缓冲系统[68]，然而即便在这种条件下，也常常难以将组蛋白 H2A、H2B 和 H3 完全溶解，或难于鉴别次要的修饰类型。在酸性-尿素缓冲系统中，加入非离子型去污剂(常为 Triton X-100 或 Triton DF-16) 可以明显地改善这类组蛋白的分辨力[69,70]。下文将详述用于组蛋白分级分离的主要凝胶系统。最后，某些组蛋白经修饰后的产物对酸不稳定（例如某些磷酸化的组蛋白），不能在酸性-尿素系统中测定，但可应用中性 pH 的缓冲系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳来分级分离[71]。Hardison 和 Chalkley[71] 最近对组蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳的各种方法作了述评。

组蛋白的 SDS-PAGE：数种方法应用于组蛋白的 SDS-PAGE，这些方法的差别在于聚丙烯酰胺凝胶中应用双丙烯酰胺的比例不同；以及确切的缓冲条件也不相同，例如，含有或缺乏尿素或 SDS。Thomas 和 Kornberg[72] 用 Laemmli 的碱性系统[7]（表 2），并在三个方面加以改进：分离胶(18%聚丙烯酰胺)中的 Tris 缓冲液浓度增加到 0.75 mol/L，丙烯酰胺与双丙烯酰胺的比值增加到 30:0.15，以及电极缓冲液含有 0.05 mol/L Tris、0.38 mol/L 甘氨酸、0.1% SDS，其 pH 为8.3。试剂及凝胶制备中的其它详尽说明可参阅前文所述。板胶的厚度为 1.5mm，长或为 15cm 或为 30cm。用于电泳的样品可为纯的

表 10 测定寡肽分子量的尿素-SDS-PAGE 系统[a]

丙烯酰胺-双丙烯酰胺：12.5 g 丙烯酰胺和 1.25 g 双丙烯酰胺溶于水并稀释至 50 ml，然后用 Whatman No. 1 滤纸过滤。溶液在 4℃ 下稳定。

凝胶缓冲液贮备液：含1% SDS 的 1.0 mol/L H_3PO_4 并用 Tris 碱调 pH 至 5.0。

贮液槽缓冲液贮备液：含 0.1% SDS 的 0.1 mol/L H_3PO_4 用 Tris 碱调 pH 至 6.8。

样品缓冲液：含 1% SDS，8 mol/L 尿素和 1% 2-巯基乙醇的 0.01 mol/L H_3PO_4 用 Tris 碱调 pH 至 6.8。

1. 混合下列物质以制备凝胶混合液：

丙烯酰胺-双丙烯酰胺	15.0 ml
凝胶缓冲液贮备液	3.0 ml
尿素	14.4 g
6%过硫酸铵(新鲜配制)	0.3 ml

加水至最终体积为 30 ml。

2. 溶液脱气 1 分钟，加入 20 μl TEMED，立即灌注制备柱胶[b]。

3. 溶寡肽于样品缓冲液中，加入溴酚蓝，其最终浓度为 0.002%（重量/体积）。然后将样品加热使寡肽变性，用前冷至室温。在早期的研究中[67]，加热步骤为 60℃，经历 10 分钟，但最近分析应用的是 100℃，加热 3 分钟。分子量的标志物可以通过溴化氰的裂解来制备，但也有商品供应。

4. 柱胶在 6—8 V/cm 的条件下电泳，直至溴酚蓝接近凝胶的末端。

5. 电泳后，凝胶用 0.25% 考马斯蓝 R250 的甲醇:水:冰醋酸（5:5:1）染色。在含 12.5% 异丙醇的 10%醋酸中用扩散法脱色；由于某些小肽在电泳脱色时泳动，因此不推荐应用电泳脱色法来脱色。

---

a. 根据参考文献[67]所述的方法。

b. 对样品进行比较时板胶比柱胶更优越，在板胶中应用高交联度的分离胶则凝胶极易碎裂，以致在制备样品池时池间隔常破裂。因此在 12.5%凝胶的顶部聚合一层低浓度的凝胶（3.75%），但使用同一种缓冲液，这样样品池在 3.75%聚丙烯酰胺凝胶中形成。具有前述大小的标准板胶需在 100 V 条件下电泳过夜。

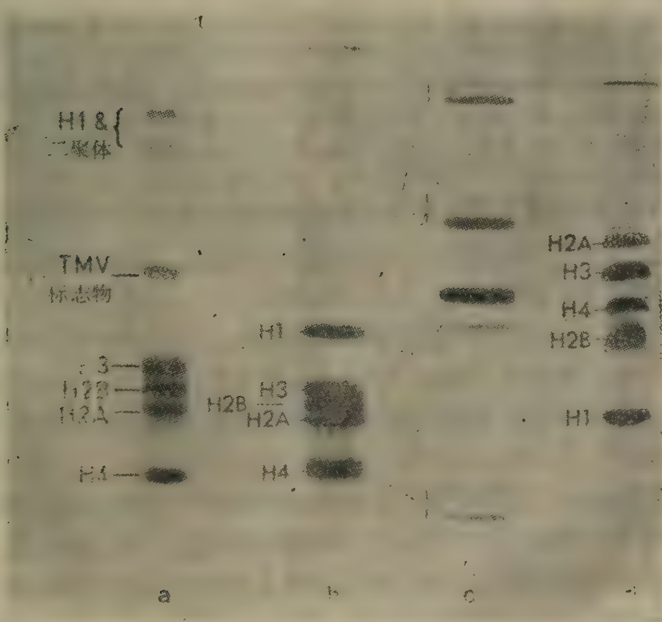


图 20 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离组蛋白。(a) SDS-PAGE（板凝胶的轨迹，经允许从参考文献[72] 中复制）；(b) 2.5mol/L 尿素-0.9 mol/L 醋酸（9 cm 柱胶）；(c) 2.5 mol/L 尿素，1.0 mol/L 醋酸（25 cm 柱胶）；(d) 2.5 mol/L 尿素-0.9 mol/L 醋酸-0.4% Triton X-100（9 cm 柱胶）。(b)、(c) 和 (d) 中的资料均经允许从参考文献 [71] 中复制。

组蛋白也可以为完整的染色质。电泳是在 30 mA 下约经 6 小时(15 cm 长凝胶),或功率为 4W 经 24 小时(30 cm 长凝胶),直到溴酚蓝染料到达凝胶的底部。按前述方法用考马斯蓝染色和脱色。分离样品的实例见图 20 a。

虽然组蛋白用 SDS-PAGE 分离主要是根据分子的大小,但它们的泳动率比依据其已知分子量所预期的速度低[73]。这可能是由于组蛋白中高百分比的碱性氨基酸降低了整个分子的负电荷。若仅仅依据组蛋白在 SDS-PAGE 上的泳动率与标准的非碱性蛋白质的比较进行计算,这种现象的实际结果将是过高地估计了组蛋白的分子量。

酸-尿素凝胶:依据电荷和分子大小在醋酸-尿素凝胶系统中分离组蛋白的区带图谱,取决于 pH 和尿素浓度,但常用的分析系统是含 2.5 mol/L 尿素的 0.9 mol/L 醋酸(pH 2.7),聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 15%[68]。不用浓缩胶。若在这类系统,在 9 cm 长的分离胶上可以将组蛋白分离为 5 个主要的区带(图 20 b),与此相反的是某些因共价修饰或序列的异质性所致的小区带,只有在更长的凝胶(25 cm)上电泳后才能观察到(图 20 c)。有关酸-尿素系统的详细内容见表 11。

表 11　分离组蛋白用的醋酸-尿素缓冲系统[a]

溶液 A:聚丙烯酰胺-双丙烯酰胺,60.0 g 丙烯酰胺和 0.4 g 双丙烯酰胺溶于水中,并稀释至 100 ml。将它与 3 g Amberlite MB-1 混合树脂搅拌 30 分钟以除去离子,并在用前过滤。溶液在 4℃ 下稳定。

溶液 B:含 4%(体积/体积) TEMED 的 43.2%(体积/体积)的冰醋酸水溶液。溶液在 4℃ 下稳定。

溶液 C:40mg 过硫酸铵加于 20 ml 去离子的 4 mol/L 尿素溶液中(用前制备)。

1. 1 体积的溶液 B 与 5 体积的溶液 C 相混合并脱气。另取两体积的 A 溶液在另一真空烧瓶中脱气。

2. 合并脱气的溶液并铸胶,其上覆盖一层冷的 0.9 mol/L 醋酸。为了使组蛋白获得最佳分离结果,聚合后的凝胶应再放置 30—60 分钟。

3. 用 0.9 mol/L 醋酸充满贮液槽后,凝胶在 130 V 下预电泳直至获得恒定电流。预电泳对组蛋白良好的分离是极为重要的。

4. 不含 DNA 的组蛋白样品溶于含 2.5 mol/L 尿素的 0.9 mol/L 醋酸中,且浓度为 1 mg/ml,然后加样。柱胶长 9cm,电泳方向是从阳极(+)到阴极(-),在 130V 室温下经历 3—4 小时。在这一系统中加入甲基绿作指示染料是有益的,因为蓝色染料恰在泳动最快的组蛋白(H4)的前面,因而可以指示电泳的进程。对于很长的凝胶(25 cm),在 200 V 恒压 4℃ 下电泳约需 48 小时。

5. 电泳后,凝胶用 0.1%考马斯蓝 R 250 的甲醇:水:醋酸(5:5:1)溶液染色,在含 10%醋酸的 25%甲醇中用电泳或扩散方法脱色。

a. 根据参考文献 [68, 71] 所述的方法。

醋酸-尿素方法的不足之一是这类溶剂不能将组蛋白与 DNA 完全解离,结果是在电泳前必须首先将蛋白质纯化以除去 DNA(见第 5 章)。此外,可在样品缓冲液中加入阳离子去污剂溴化十六烷三甲基胺(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB),使组蛋白与 DNA 完全解离[74]。

Triton-酸-尿素凝胶:将非离子型去污剂,通常为 Triton X-100, 加至酸-尿素凝胶系统中,结果在去污剂和组蛋白的疏水区之间形成胶态分子团(micells)。这导致组蛋白和去污剂形成复合物并降低了各组蛋白的泳动率,泳动率的降低与其疏水性成比例(图 20 d)。利用这一方法有可能分离的组蛋白,其疏水区域仅有一个中性氨基酸发生变化,这种变化使去污剂的结合发生改变[69]。大多数的实例中,通常是保持去污剂浓度恒定为 6 mmol/L Triton(0.4%),而尿素的浓度却发生变化(为去污剂结合的抑制剂)。尿素应用的确切浓度由欲获得良好分离的组蛋白组分决定。Triton-酸-尿素系统主要的不足是

由于甲硫氨酸残基的氧化人为地使组蛋白发生变化;氧化后的组蛋白改变了 Triton 的结合特性。为了避免这种可能的假象,样品不得不分离出来并贮存在还原剂存在的条件下。聚丙烯酰胺凝胶预电泳后必须用还原剂净化(凝胶的聚合是以氧化剂作催化剂)。Zweidler 对本法作了详尽的说明[70]。

核的非组蛋白

这类蛋白质具有明显的凝聚倾向,若人们在非解离条件对其进行电泳分离,则有相当数量的蛋白质以凝聚状态保留在凝胶的顶部。通常仅含有 SDS 或尿素的系统即足以使蛋白质完全解聚,而不必二者都存在于凝胶和样品溶液中。实际上,利用表 2 所叙述的 SDS-PAGE 不连续系统,在适当的溶液中加入尿素,使凝胶中的最终浓度达 4mol/L 即能获得良好的分离效果[75]。对于大多数复杂的混合物,已证实用 12—15%聚丙烯酰胺凝胶是合适的。

制备电泳样品时,应避免能产生沉淀的步骤。样品对 0.1%(重量/体积) SDS 透析后最好用冰冻干燥方法浓缩。此外,浓缩 SDS 或尿素溶液中的蛋白质也可以应用聚乙二醇或 Sephadex G-200。

将蛋白质样品溶于 1%(重量/体积) SDS、5%(体积/体积) 2-巯基乙醇和 8mol/L 尿素溶液中并加在凝胶上。由于尿素可能产生的问题是出现氰酸盐离子,一般建议加入 5 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)。同样,如有可能应当避免对样品加热,因为加热样品可显著增加氰酸盐离子生成的速率。溶液中含 8 mol/L 尿素足以增加样品的密度,并确保在不加入蔗糖或甘油的条件下加样品于凝胶上无困难。

凝胶可以用前已述及的方式用考马斯蓝染色。脱色后,揭示出大部分非组蛋白部分是极复杂的混合物。由于这一原因,双向凝胶电泳可以更好地测定这类复杂的样品,目前已被认为是更为有益的分析方法(见第 5 章)。

核糖体蛋白

核糖体蛋白是不易溶解于非解离缓冲液中的碱性蛋白质。可以根据分子大小在10%丙烯酰胺凝胶上,用 SDS-磷酸缓冲系统(如参考文献 [76]) 将核糖体蛋白成功地分离开来。也可以应用 SDS-不连续缓冲系统,尤其是应用 6—18%线性梯度凝胶,可以获得良好的分离效果。在上述各种条件下,核糖体或核糖体亚基都能直接溶于含 SDS 的样品缓冲液中,而不必除去 RNA。

利用分子大小和电荷分离核糖体蛋白质时,需用尿素以保持样品的可溶性。分离可在连续缓冲系统(如含 0.9 mol/L 醋酸的 6.0 mol/L 尿素;参考文献 [77]) 或在经 Reisfeld 等改进的含 8 mol/L 尿素的低 pH 不连续系统(参考文献 [10]; 表 4)中完成[78]。然而,虽然 SDS-PAGE 一直广泛用于核糖体蛋白质的单向电泳分离,但目前个别核糖体蛋白质更详尽的研究,其中包括利用电荷分离的研究,是采用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(见第 5 章)。

膜蛋白

过量的 SDS 能溶解原核或真核细胞全部或接近于全部的膜蛋白。因此,SDS-PAGE

目前广泛用来研究膜蛋白混合物的复杂性及多肽分子量的测定。膜的 SDS-PAGE 方法与前已叙述的其它蛋白质的方法相同，但最好是在样品缓冲液中加入 8 mol/L 尿素，以确保膜蛋白的变性(如参考文献［79］)。此外，暴露于细胞表面的浆膜蛋白的检定是用 ^{125}I 通过乳过氧化物酶 (Lactoperoxidase) 法标记其酪氨酸[80]，随后将全细胞提取物的 SDS-PAGE 作放射性自显影。也可以应用其它几种试剂对细胞表面蛋白质作放射性标记[81]。

缺点之一是 SDS 抽提膜常使溶解的蛋白质失活。相反，用 Triton X-100 代替 SDS 来抽提膜常能保存蛋白质的生物活性，不足之处是这种去污剂不能提取所有的膜蛋白。提取后，用已介绍过的 SDS-不连续缓冲系统方法来分级分离蛋白质，但方法中用 10%(体积/体积) Triton X-100 代替 10%(重量/体积) SDS。Dewald 等[82] 对膜蛋白的制备及用 Triton X-100 电泳，和某些膜的标志酶的测定作了更详尽的说明。Lubrol[83] 和 Sarkosyl[83] 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中，也用其它去污剂如脱氧胆酸钠[82] 来分析膜蛋白。

还有其它目的在于溶解所有膜蛋白的电泳系统，但与 SDS-PAGE 不同，它们的分级分离是根据分子的电荷和分子大小。早期广泛应用的方法是用酚:醋酸:尿素溶解，然后在含 5 mol/L 的尿素和 35% 醋酸的酸性凝胶中电泳[84]。三氯乙醛水合物也能极其有效地溶解膜蛋白，然后在含有这一试剂的聚丙烯酰胺凝胶中依据分子电荷和分子大小来分级分离膜蛋白[85]。目前这些方法很少应用。

最后，人们可以在聚丙烯酰胺凝胶上进行膜蛋白的“电荷转移电泳”(charge-shift electrophoresis)。这一方法的根据是完整的膜蛋白具有使其固定于膜脂上的疏水区域，而外周膜蛋白或可溶性蛋白质则无此疏水区。即亲水性蛋白质结合 Triton X-100 数量很少，甚至不结合，而具有疏水区域的膜蛋白能结合大量的 Triton X-100。因此，与单纯 Triton X-100 相比较，在 Triton X-100 离子型去污剂混合物中，完整膜蛋白的泳动率发生改变(它们形成了带电的离子型去污剂 Triton X-100-蛋白质复合物)，而亲水性蛋白质的泳动率不变。Helenius 和 Simons[86] 最初的研究是利用琼脂糖凝胶电泳。然而，这一方法也可以用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。例如 Bordier 等[87]发现在 SDS-不连续缓冲系统中，用 0.5% Triton X-100 加 0.25% 脱氧胆酸钠代替 SDS，与单独的 Triton X-100 去污剂相比较，四种膜蛋白复合物泳动率显著增加，表明这类膜蛋白包含有疏水区域，因而可能是完整的膜蛋白。泳动率改变的幅度应该是膜蛋白中疏水区域大小的量度。

浓度梯度凝胶

浓度梯度凝胶的应用

随着泳动距离增加而丙烯酰胺浓度也逐渐增加(因而孔径逐渐减小)的梯度聚丙烯酰胺凝胶，目前已广泛用来代替单一浓度的凝胶。它不仅应用于样品蛋白质的组成分析，也用于以 SDS 作解离剂的分子量的测定。虽然阶梯式梯度 (step gradients)(在这种梯度中，不同浓度凝胶一层重叠于另一层之上)曾用于早期的工作中，但是在两层凝胶的交界处可人为地产生多种组分区带的假象。目前常用的是连续丙烯酰胺浓度梯度。在线性或凹形梯度中，常用的浓度是 3—30% 丙烯酰胺，实际选择的范围取决于待分级分离蛋白质的大小。在梯度凝胶中电泳时，蛋白质泳动直至孔径减小到阻碍蛋白质进一步泳动[88]。当这种“孔径限制”一旦达到，蛋白质区带图型不再随时间明显改变，尽管区带的移动并未完全停止。

梯度凝胶电泳的主要优点之一是泳动的蛋白质不断地进入孔径逐渐减小的凝胶区，因此泳动蛋白质带的前沿比后沿阻滞更甚，结果形成的蛋白质带区带明显。此外，孔径的梯度增加了在一块凝胶上能同时分级分离的分子量范围。因此，与单一浓度的凝胶相比较，用 SDS-PAGE 的梯度板胶，不仅能将复杂的蛋白质混合物分离成更清晰的蛋白质带，而且几乎可以测定全部组分的分子量，而不问其分子量的大小。在梯度凝胶中，曾用非解离缓冲系统来分析天然蛋白质，但目前应用较少(见下文)。

用梯度凝胶测定分子量

SDS-PAGE (SDS-变性蛋白质)：对于均一浓度的聚丙烯酰胺凝胶，在分子量的对数 ($\log_{10}$) 与 R_f 值或 SDS-多肽复合物泳动的距离之间存在着线性关系。然而，对于线性浓度梯度凝胶，线性关系则存在于分子量的对数 ($\log_{10}$) 和聚丙烯酰胺浓度 (%T) 的对数 ($\log_{10}$) 之间[89,90,91]。可以预计，即便在非线性浓度梯度中也存在着这种关系，但应用线性梯度计算% T的数值更简便。方法是将未知样品蛋白质和一套适宜的标准蛋白质加于一块线性梯度的板胶上，然后进行电泳，直至标志染料到达凝胶的边缘。染色后测量蛋白质区带位置并计算每条区带相对应的%T。例如，在 5—20% 聚丙烯酰胺凝胶上泳动至一半距离的某种多肽，其 %T 将为 12.5%。以标准蛋白质分子量的对数 ($\log_{10}$) 对 log %T 作图，可得到一条标准曲线，从标准曲线上可以测定样品蛋白质的分子量。重要的是对每一具体的板胶，必须同时电泳分子量已知的标志蛋白质，并绘出该凝胶的标准曲线。

多肽分子量的对数 ($\log_{10}$) 和 log %T 的线性关系范围由聚丙烯酰胺梯度条件决定。例如，7—25% T(C_{Bis} = 1%)，分子量约在 14,300—330,000 之间[91]；5—20% T(C_{Bis} = 2.6%)，分子量约在 14,300—210,000 的范围(图 21)；3—30% T(C_{Bis} = 8.4%)，分子量约在 13,000—950,000 之间[90]。对于分子量的测定，每一实例均较受严格限制的任何单一浓度的聚丙烯酰胺凝胶优越。而且某些证据表明，糖蛋白在梯度凝胶中进行 SDS-PAGE 时，与在单一浓度凝胶中的行为不同，不表现异常行为，可能是由于梯度凝胶中的孔径梯度所引起的分子筛效应，超过了由于糖蛋白结合 SDS 的数量较少所引起的异常电荷效应。因此，能选用梯度凝胶作糖蛋白分子量测定的基质。

梯度凝胶除了上述优点外，重要的是应当注意，用梯度胶分离二种蛋白组分的效果并不比用单一的、最适浓度的聚丙烯酰胺凝胶好(见第 2 章)。因此，操作时应当先用梯度胶作 SDS-PAGE 以测定蛋白质混合物的复杂性，并获得组分分子量的计算值。若多肽分离良好，即表示此条件适宜。然而，若有关的蛋白质分子量的分布范围较小，那么应当用合适的单一浓度凝胶进行 SDS-PAGE，以获得组分的最佳分离。

天然蛋白质：就象在 SDS-PAGE 的情形一样，与均一浓度的凝胶相比较，梯度凝胶能在更大的分子量范围内对天然蛋白质进行分离，同时能获得更清晰的蛋白质区带。某些研究者(例如参考文献[92,93])基于天然蛋白质的泳动距离，用聚丙烯酰胺梯度凝胶来测定其分子大小，而另一些作者发现，只是当所研究的蛋白质为单一的肽链及均一的低聚物时，测得的数值才准确[89]，并且提出在线性聚丙烯酰胺梯度凝胶上电泳的天然蛋白质的分子量，最好是通过测定其在凝胶中泳动的速率来确定[90]。象单一浓度凝胶一样，与用含 SDS 缓冲液在梯度凝胶上测定多肽分子量相比较，在天然蛋白质分子量的测定中很少应用梯度凝胶。

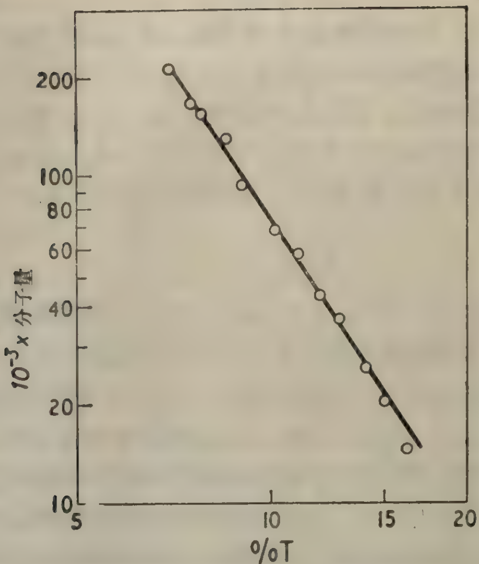


图 21　在 5—20%线性梯度板胶中，以多肽分子量的对数($\log_{10}$)与 $\log_{10}$%T 作图所获得的校正曲线。按分子量递减顺序排列的标志多肽为：肌球蛋白（分子量 212,000)，RNA 聚合酶 β'(165,000) 和 β 亚基 (155,000)，β-半乳糖苷酶 (130,000)，磷酸化酶 a(92,500)，牛血清白蛋白 (68,000)，触酶 (57,500)，卵清蛋白 (43,000)，甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (36,000)，糜蛋白原 A (25,700)，大豆胰蛋白酶抑制剂 (20,100) 及溶菌酶 (14,300)。

浓度梯度凝胶的制备

实验室中很容易制备线性和凹形梯度浓度的板胶和柱胶，虽然梯度板胶的应用远比相应的柱胶广泛。大量制备梯度柱胶或板胶需要利用一种专用的凝胶形成塔。然而，梯度板胶一次常需要一至二块。因此，虽然用凝胶形成塔能大量制备和贮存板凝胶，但板胶的逐一制作常更方便。若有一台蠕动泵和一个合适的梯度发生器(见下文)，即可方便地制作。

除丙烯酰胺浓度梯度外，常在凝胶中形成蔗糖或甘油的密度梯度，以减少由于聚合产生的热引起对流扰动使凝胶液掺混。为了避免凝胶液的混合，某些工作者令聚合催化剂形成梯度，以便聚合作用首先在凝胶的顶部(低浓度丙烯酰胺)发生，然后逐渐移至底部。

线性梯度板胶：有作为商品的线性梯度发生器，或者在实验室内用有机玻璃制造。两贮液槽的横截面积必须严格相等(否则不能产生线性梯度)，两贮液槽之间由一两通阀门控制的管道相连接。利用这类设备制备线性梯度板胶的典型装置见图 22。梯度发生器的出口通过细孔径的塑料（Tygon）管与蠕动泵相连，然后再连到按前述方式组装的玻璃板夹层中。将塑料管切成 45° 角，用胶布将切口的边缘固定在夹层中未开槽口玻璃板的中央位置上（图 22)。按照这一操作程序，首先将浓度最大的丙烯酰胺溶液注入玻璃板夹层中，沿着未开槽玻璃板的内表面流至底部。随着夹层中丙烯酰胺混合液水平面的增高，丙烯酰胺浓度持续降低。若细心地进行上述操作，出现混合的可能性出人意外地少。某些商品仪器和自制装置在制备丙烯酰胺浓度梯度时，系从一块板胶托架的底上注入丙烯酰胺混合液。此时，首先将浓度最低的丙烯酰胺混合液注入夹层中。

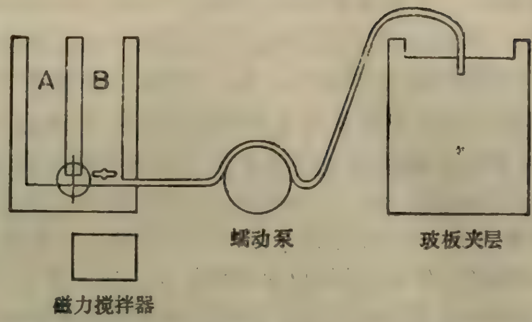


图 22　制备梯度聚丙烯酰胺板胶的装置。 A 和 B 分别为梯度发生器的贮液槽和混合室，用夹钳安装在磁力搅拌器上方约 1cm 处。混合室 B 内置磁芯棒并经一两通阀门控制的通道与贮液槽 A 相连。连接梯度发生器、蠕动泵及玻璃板夹层的塑料管内径为 0.075 cm 或 0.15 cm。 最简便的方法是将塑料管切成 45° 角，然后固定在无槽口玻璃板内面中间的位置上，切口的边缘朝向这块玻璃板，将塑料管向板中心推进约 1 cm 并在二玻璃板之间固定住管的切口。 若塑料管的外径太大使管不能插入中心部位，可切一段适当大小的细孔径塑料管，或用一支注射针头插入塑料管中即足以克服这一困难。

用于制备梯度凝胶的丙烯酰胺混合液的确切组成，取决于浓度梯度的范围及应用的缓冲系统。大多数梯度凝胶进行 SDS-PAGE 所应用的是 SDS-不连续缓冲系统（表 2）。两种分别相应于梯度中浓度最低和最高的丙烯酰胺混合液，按表 2 所述细节制备，但聚合催化剂的数量减少，以便操作者在凝胶聚合之前有时间制备梯度，同时令最高浓度的丙烯酰胺混合液含有 15%（重量/体积）蔗糖（4.5g/30ml），以便稳定密度梯度。表 12 列出了用于 SDS-不连续缓冲系统，制备 5—20% 线性梯度凝胶（2.6% 双丙烯酰胺）混合液的组成。

表 12　制备 5—20%梯度凝胶的凝胶混合液

5%丙烯酰胺混合物[a]：
5.0ml 丙烯酰胺-双丙烯酰胺（30:0.8）
3.75ml 分离胶缓冲液的贮备液；3.0mol/L Tris-HCl（pH 8.8）
0.3ml 10% SDS
0.7ml 1.5% 过硫酸铵
20.25 ml 水
20%丙烯酰胺混合液[a]：
20.0ml 丙烯酰胺-双丙烯酰胺（30:0.8）
3.75ml 分离胶缓冲液贮备液；3.0mol/L Tris-HCl（pH8.8）
0.3 ml 10% SDS
0.7ml 1.5%过硫酸铵
4.5g 蔗糖(相当 2.5 ml)
2.75 ml 水

a. 临近灌注凝胶之前加入 TEMED（10μl）以起动聚合反应(见正文)。

凝胶混合物脱气，然后向每分凝胶混合液中加入 TEMED（每 30 ml 凝胶混合液加 10 μl）。将浓度低的混合液加于贮液槽 A（图 22），打开梯度发生器 A、B 贮液槽之间的连通管，使其充满混合液，然后将其关闭。让已经流入混合室 B（图 22）的凝胶溶液全部返回贮液槽 A。在贮液槽 B 内加入等体积的高浓度的混合液。计算出的 A、B 槽中溶液体积，应相当于最终的分离凝胶体积的一半。对于标准的有槽口的玻璃板组装物，每个贮液槽

需要 15 ml 丙烯酰胺混合液。可以用磁力搅拌器将贮液槽 B 中的溶液混合，但须细心以防由于磁力搅拌器产生的热而引起过早地聚合。为了避免发生这种情况，应当将梯度发生器支撑（用一支夹钳）在搅拌器上方约 1 cm 处。将梯度发生器贮液槽间的阀门打开，并开动蠕动泵和磁力搅拌器。凝胶混合液流入玻璃板夹层的流速应当约为 3.0 ml/分钟。凝胶混合液定量地流入夹层后，梯度发生器上的出口管与梯度发生器断开，并浸入盛有同一缓冲液的烧瓶中[即 3.75 ml 3.0 mol/L Tris-HCl，pH 8.8，0.30 ml 10% SDS（重量/体积），25.95 ml 水]，流量降至 0.5 ml/分钟。这一操作用来在分离胶上铺一层缓冲液。梯度注入后立即用水冲洗梯度发生器，以防止丙烯酰胺在装置中聚合。板胶聚合后，将凝胶倾斜以除去覆盖液，在应有位置上按前述方法聚合浓缩胶及制备样品池。

某些工作者在灌注梯度凝胶时，宁愿用核黄素作聚合催化剂而不用过硫酸铵，因为它可以容许有更充裕的时间来进行操作而不必担心凝胶过早地聚合。这时核黄素在凝胶混合液中的最终浓度为 0.5 mg/ml，以代替过硫酸铵，混合液注入后在荧光灯下光照 30 分钟使梯度凝胶聚合，然后可加入浓缩胶。实际上，在聚合过程中蔗糖梯度即足以稳定丙烯酰胺的梯度，所以不需要为保证板胶先自顶部聚合而制备聚合催化剂的梯度。但是，在发生对流混合问题的场合，应当调节催化剂的浓度，以便低浓度丙烯酰胺混合液在 25—30 分钟内聚合，高浓度混合液则在 40—45 分钟内聚合。

凹形梯度板凝胶：用制备线性梯度凝胶的梯度发生器，可以形成凹形梯度聚丙烯酰

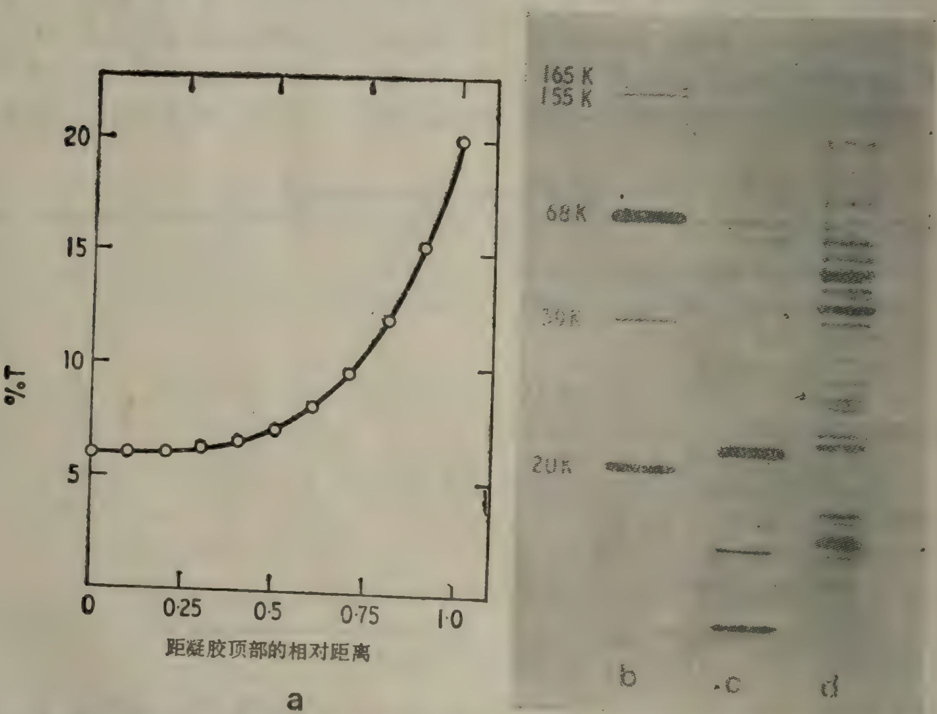


图 23 梯度聚丙烯酰胺凝胶的应用。a 按正文中所述方法制备的 5—20%凹形（“指数形式”）梯度凝胶图。b 和 c，RNA 聚合酶 α、β 及 β′ 亚基，牛血清白蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂，用 SDS-不连续缓冲系统分离后分别分布在线性 5—20%及凹形 5—20%聚丙烯酰胺板胶上。多肽分子量在凝胶轨迹旁标出。d，用线性梯度聚丙烯酰胺板胶分析复杂的多肽混合物的实例；样品为盘基网柄菌 [^{35}S] 蛋氨酸标记蛋白质的亚组分，在 6—18%线性梯度聚丙烯酰胺板胶上，用 SDS-不连续缓冲系统分析的结果。利用梯度板胶分级分离其它复杂多肽的实例见图 2 及 15。

胶板胶。例如，制备总体积为 30ml ‘5—20%’的凹形梯度凝胶，是将 7.5 ml 20%丙烯酰胺混合液置于混合槽 B 中，并用一个橡皮塞封住槽口。短暂地插入一皮下注射器针头，使槽内压力与大气压平衡。贮液槽 A 中装人 22.5 ml 5%丙烯酰胺混合液。然后按制备线性梯度凝胶的同样方式灌注板凝胶(见前文)。灌注时，槽 B 的体积维持恒定，并不断地被来自贮液槽 A 的液体稀释。这种方法产生呈指数形式降低的丙烯酰胺浓度梯度，结果形成如图 23 a 所示的凹形浓度梯度，其范围从凝胶底部的 20% 到凝胶顶部的 6% 左右。 如有必要，可在相应的部位聚合浓缩胶。

样品制备及电泳

样品制备与均一浓度凝胶应用的方法相同。电泳条件取决于缓冲系统及构成梯度的凝胶浓度，对于上述使用 SDS-不连续缓冲系统的 5—20% 线性梯度凝胶，或在 25 mA 恒流下电泳 5 小时，或在 90 V 恒压下电泳过夜，或者待示踪染料泳至凝胶的底部。电泳后凝胶的分析与均一浓度聚丙烯酰胺凝胶的方法相同。线性或凹形梯度凝胶分离后的蛋白质区带在染色后均极为清晰(分别见图 23 b 和 23 c)，但区带的分布取决于选用的梯度类型；凹形梯度凝胶对高分子量多肽的分离优于线性梯度凝胶，但对低分子量多肽的区带分离能力下降。在作者实验室中，由于线性梯度凝胶图象比凹形梯度凝胶更适宜于多肽分子量的测定，所以对于分子量范围较大的复杂的多肽混合物作单向 SDS-PAGE，常采用线性梯度板胶(例如图 23 d)。

大批量凝胶

若有多通道蠕动泵及体积足够大的梯度发生器，可以一次制备数块梯度凝胶。利用凝胶形成塔，可以制备数量较多的梯度板胶，已有几种类型的商品，虽然其中每一种仅用来制作一种大小规格的板胶。然而在实验室中也可以用有机玻璃方便地制作适当的装置。实际上是由一只有机玻璃盒构成，盒的底部逐渐变细而成漏斗状以托住板胶的组装物。凝胶混合液从漏斗状的底部进人装置，它降低了液体流速并扩大液体的水平截面，并且与凝胶支托物的底部面积相对应。有关凝胶塔的构成和应用的详细说明参见有关文献[88,94,95]。利用凝胶塔制作梯度板胶的最大实际问题，是如何避免在体积如此大的丙烯酰胺进行聚合反应时，释放大量的热所引起的对流。出于这一理由，重要的是设计聚合催化剂的浓度应使催化聚合的发生是从顶部开始再逐渐至底部。

除了制备梯度板胶外，凝胶塔也可用于制备大量浓度均一的板胶或柱胶。

微型柱胶和微型板胶

为了分析少量的蛋白质，已建立起许多微型凝胶系统。最小的凝胶是在毛细管中形成聚丙烯酰胺凝胶，能分析单个细胞中所含的蛋白质。用适当大小的毛细管，可以制作 1—100 μl 均一浓度或梯度浓度的聚丙烯酰胺凝胶。 Neuhoff[96] 利用体积为 5 μl 的毛细管凝胶，染色后检测了 1 ng 的白蛋白。微型板胶也用于蛋白质的分析，但对某一蛋白质所得到的最高灵敏度是 20 ng。

微型柱胶

Neuhoff[96] 叙述了制备和分析毛细管均一浓度和梯度浓度凝胶的详细方法。 对于均

一浓度的凝胶是将毛细管浸人凝胶的混合液中，使凝胶充满总体积的 2/3 左右。然后将它们揿入约厚 2 mm 的代用粘土垫上，将毛细管底部密封，用一支直径比盛凝胶的毛细管更细的硬质玻璃毛细吸管吸水铺在凝胶上。聚合后，除去覆盖层并用毛细吸管加蛋白质溶液（0.1—1.0 μl，浓度 1—3mg/ml）于凝胶上，毛细管中的空隙用电极缓冲液注满。注满后，折断毛细管插人代用粘土中的那部分，将凝胶电泳。Grossbach[97] 不用代用粘土作凝胶的密封剂，而用微型操作器制备 50μl 毛细凝胶。还能在相应的位置上聚合分离凝胶和在加样之前聚合浓缩胶。利用毛细作用[98] 或梯度发生器[99] 能在毛细管中制备梯度凝胶。

尽管有了这些方法，但近几年来很少利用毛细柱胶，其原因可能是为了获得良好的凝胶（特别是以水作凝胶的覆盖物）需要有一定的经验，而且与标准的柱胶比较，蛋白质组分的分离也不佳，至少在较小体积的毛细管凝胶中是如此。此外，染色蛋白质区带的定量只能用微量光密度计测定，而不能用常用的扫描分光光度计。However Condeelis[100] 描述在 100 μl 和 250 μl 体积的 Drummond microcaps 中制作的中等大小凝胶，可以分析毫微克范围的蛋白质（图 24）。能应用本章介绍的各种连续和不连续凝胶的缓冲系统，但是 Condeelis[100] 发现，这种大小的凝胶用不连续缓冲系统并不改善分离的效果。表 13 列出了这种微型凝胶对蛋白质的负荷量和灵敏度。也许最有用的微型凝胶是 250 μl 大小的凝胶，它们能测定 2 ng 的某一蛋白质，象标准尺寸的凝胶一样，可以用扫描分光光度计对蛋白质区带定量。

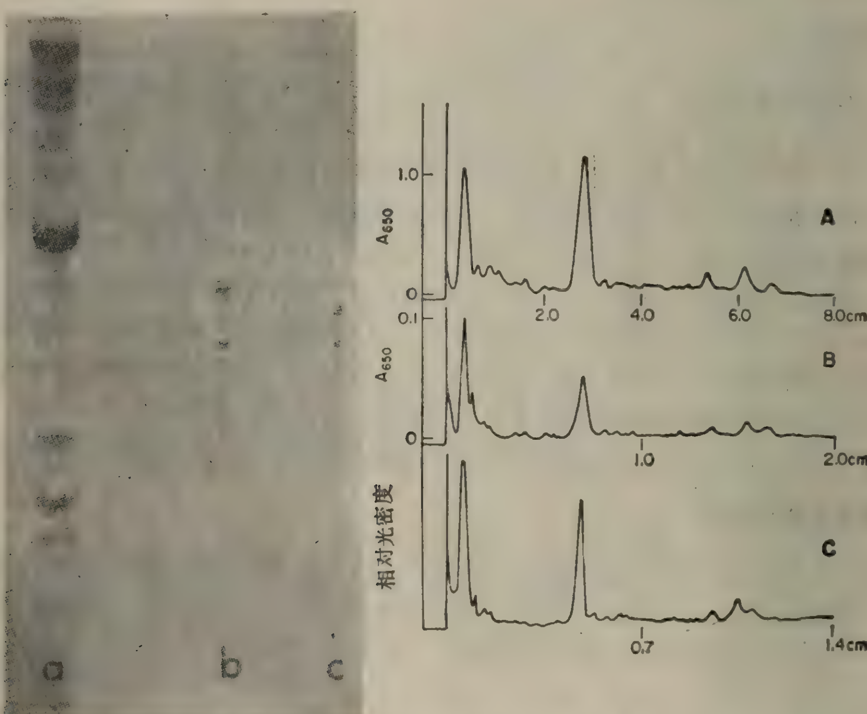


图 24 微型聚丙烯酰胺柱胶的应用。兔骨骼肌肌动球蛋白的提取物的电泳：a，20 μg 总蛋白加在标准的 0.5 cm 内径的柱胶上，b，总蛋白 0.5 μg 加在 0.15 cm 的微型柱胶上，c，总蛋白 0.1 μg 加在 0.07 cm 微型柱胶上。凝胶用 SDS-不连续缓冲系统电泳，然后用考马斯蓝染色。A、B 和 C 分别为 a、b 和 c 三种凝胶在光密度计上扫描的结果。经允许从参考文献［100］复制。

微型板胶

已报道的某些微型板状聚丙烯酰胺凝胶装置，最小的型式是从显微镜载玻璃片上切下的玻璃板制成，大小为 7.5 cm × 2.5 cm[101] 或 7.6 cm × 3.8 cm[102]。它们有可能在清晰的区带中检测出 20 ng 的蛋白质。但是如此大小的凝胶应用时会产生某些问题。沿凝胶长轴方向电泳时仅能同时电泳三个样品，而与标准规格大小的凝胶相比，沿短轴方向电泳分离组分则更受限制。因此，微型板胶的应用有限是在意料之中的。最近 Matsudaira 和 Burgess[95] 报道了一种中等大小的板胶（8.2cm × 9.2 cm），该凝胶对 21 个样品具有良好的分离能力，对某一蛋白质的灵敏度为 20 ng，尽管对很深的区带需要加样 100 ng。

琼脂糖-丙烯酰胺混合凝胶

不能制备单体总浓度小于 2.2% 左右的聚丙烯酰胺凝胶。单体总浓度在 2.2—3.0% 的凝胶虽能产生胶凝作用，但难以操作，低浓度凝胶几乎是一种粘性液体。对于大多数蛋白质的电泳分析，研究者不可能应用这种低浓度的丙烯酰胺凝胶。但是，加入最终浓度达 0.5% 的琼脂糖则增加了机械强度，并应用于核糖体、聚核糖体[103,104] 和某些病毒的分级分离。与由 8 个核糖体组成的多核糖体粒子在凝胶中泳动，其泳动率大体上与粒子重量的对数（$\log_{10}$）相对应。S. L. Bunting 和 A. C. Peacock 博士详尽叙述了混合凝胶的制备及其电泳技术[104]。

表 13 微型柱胶的性质[a]

柱胶型式	蛋白质的最大载量（μg）	每条区带能测定的最小量（μg）	样品体积（μl）
250μl Drummond microcap 中的微型柱胶	2.0	2×10^{-3}	0.25—2.0（最适值 0.5）
100μl Drummond microcap 中的微型柱胶	0.5	3×10^{-4}	0.1—0.5（最适值 0.2）

a. 数据经允许摘自参考文献 [100]。

均一性和同一性

在某一实验条件下用聚丙烯酰胺凝胶区带电泳，测得的蛋白质区带即使表现为一条也不能证明其均一。由于在聚丙烯酰胺凝胶电泳中应用非解离的缓冲条件所引起的分级分离作用，是根据分子的大小和电荷，因此可能有两种蛋白质，其电荷量或分子大小各不相同，但在所选择的条件下电泳的泳动速率相同，并形成一条区带。因此，在确定蛋白质样品的均一性或同一性之前，天然蛋白质总是应当在几种不同的 pH 及凝胶浓度中作电泳分析。第 2 章叙述了用 Ferguson 作图法分析同一性的试验。由于 SDS-PAGE 分级分离仅仅依据分子的大小，与此同时所观察到的蛋白质带数目不一定与样品混合物中各种多肽的数目相等；任一区带都可能含有几种分子量完全相同的不同组成。由于上述原因，为了测定蛋白质的均一性，日益广泛采用的方法是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳（见第 5 章），即第一向是以蛋白质的电荷量为基础，第二向用 SDS-PAGE 则根据分子的大小将蛋白质分离。双向聚丙烯酰胺凝胶电泳后显现为一个斑点的即为均一性的良好指征，尽

管不是绝对的证据(见第 5 章)。

若单向聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的有关蛋白质区带为单一的纯蛋白质，可用某些方法获得该蛋白质的结构及与其它蛋白质在同一性或非同一性方面的资料。

(i) 仅用 5—10 nmol 蛋白质即能从凝胶上直接测定染色蛋白质带的氨基酸组成[105,106]。令人遗憾的是,由于聚丙烯酰胺水解产生大量氨,妨碍了碱性氨基酸的测定,因此最好是在分析前将蛋白质洗脱下来。仍然可能遇到的问题之一是聚丙烯酰胺凝胶常含有杂质，随着氨基酸组成测定灵敏度的增高，杂质的影响也变得越来越重要。就象预计的那样,干扰的程度取决于洗脱的凝胶体积。通过分析等体积空白凝胶切片,可以对这一问题作某些校正。

(ii) 用肽图法也可以对聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的多肽定性。若得到少量的多肽,可以在胰蛋白酶消化前从凝胶上将多肽洗脱,随后用放射性碘标记,可增加检测肽的灵敏度[107,108]。Elder 等[109]叙述了一种更为简单的方法，即用 SDS-PAGE 分离的多肽在凝胶上用放射性碘标记和用胰蛋白酶水解。胰蛋白酶水解的肽片易于从凝胶上洗脱，并用双向层析和放射性自显影分析。利用仅仅微克量的总蛋白可以分析完整的多组分系统。方法是在固定、染色的蛋白质带上，甚至在贮存数年的干凝胶上进行,仅需工作数天。若蛋白质混合物过于复杂不能将其适当地分离开来,最好用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(见第 5 章),然后应用 Elder 肽图法进行分析。这种肽图法在方法学上的唯一缺点是在分析的蛋白质中，必须含有某种对放射性碘化作用敏感的氨基酸残基(见附录 II)。另一种快速的肽图法是将经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的蛋白质,在凝胶上令蛋白质水解,随后进行第二向的 SDS-PAGE 分离，这时肽的产物依照分子的大小分离开来[110]。第 6 章将详述这一方法。

(iii) 有几种方法可用于经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后的蛋白质的N末端氨基酸的序列分析,这些方法均借助于异硫氰酸苯酯 (phenylisothiocyanate, PITC) 起反应,顺序地除去N末端氨基酸，即称 Edman 降解法。起初，Wiener 等[111]介绍将蛋白质洗脱到含 SDS 的缓冲液中,随后应用改良的丹磺酰-Edman 降解反应。虽然操作相对简便,但这种方法只能鉴定数量较少的残基。重要的改进是 Bridgen 所叙述的自动固相程序[112,113]。蛋白质从凝胶上洗脱,并与二-异硫氰酸苯酯活化的 (di-isothiocyanate-activated) 玻璃介质共价连接，然后用 [^{35}S]-PITC 进行 Edman 降解。用薄板层析,随后再用放射性自显影来鉴别放射性氨基酸的衍生物。应用这一方法，10 μg 溶菌酶 (700 pmol) 就足以测定 20 个N末端氨基酸残基的顺序[113]。Laursen 和 Machleidt 对固相序列法的最新进展作了述评[114]。蛋白质也能在聚丙烯酰胺凝胶电泳和序列分析前在体内标记[115]。虽然理论上可能具有极高的灵敏度，但是这种方法只能应用于在体内标记能产生比活性高的数量有限的蛋白质。Bhown 等讨论了这类限制及用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的蛋白质其它的序列分析策略[116]。

(iv) 虽然在非解离缓冲系统中易于将蛋白质从电泳的凝胶上洗脱下来，同时还可以比较不同蛋白质区带的生物活性，但是对于用 SDS-PAGE 分离的变性多肽有时也能作到这一点：用尿素和 Dowex 树脂[117]或通过含尿素的聚丙烯酰胺凝胶电泳[66]以除去 SDS，可成功地将几种从凝胶上洗脱下来的酶恢复其天然状态。作为这一方法的发展，Manrow 和 Dottin[118] 叙述了一种双向凝胶系统的方法，蛋白质混合物在柱胶上用 SDS-

PAGE 作第一向分级分离，然后用板胶在尿素和 Nonidet P 40 存在的条件下，作第二向的等电聚焦。第二向凝胶中的尿素和非离子型去污剂从多肽中除去了 SDS，随后用缓冲液平衡以除去板胶中的尿素，其结果是多肽恢复了天然状态，并能通过生物活性的分析来定位。因此，本法既具有双向凝胶电泳的高分辨率，又能在功能的基础上鉴别分离的多肽。最近，Hager 和 Burgess[119] 叙述了另一种方法，此法至少对某些蛋白质的复性比用尿素优越。在 SDS-PAGE 后用 KCl "染色"，在凝胶上显现出蛋白质区带，切下区带并碾碎，多肽在含 0.1% SDS 缓冲液中扩散洗脱。再用丙酮沉淀浓缩多肽（大部分 SDS 除去）。沉淀溶于盐酸胍并稀释，多肽则恢复到天然状态。恢复到最初活性的百分数取决于选择的复性方法以及研究的具体蛋白质。

(v) 某些蛋白质自身的许多特性，只能利用由该蛋白质产生的抗体所进行的免疫沉淀反应和 SDS-PAGE 来确定。从聚丙烯酰胺凝胶上洗脱下来的蛋白质可以作为免疫抗原，也可以将整个凝胶切片浸软后注射。若用 SDS-PAGE 制备多肽，通常不必在注射前除去 SDS，形成的抗体常常既能沉淀天然蛋白质又能沉淀变性蛋白质。单专一性抗体（monospecific antibody）借助载体蛋白的直接免疫沉淀或间接免疫沉淀，即单专一性兔 IgG 再用羊抗兔 IgG[121]，可用来从复杂的混合物中沉淀蛋白质。然后用去污剂如 Triton X-100[122] 或用含去污剂的蔗糖离心[120] 反复洗涤除去污染蛋白质。一种较新的方法是利用金黄色葡萄球菌蛋白 A，它是细菌的包膜蛋白，并对包括 IgG 在内的某些免疫球蛋白的 Fc 部分具有极强的亲和力[123,124]。加入灭活的金黄色葡萄球菌以便结合免疫复合物，然后通过细菌的自然沉降来纯化。更细致的改进是不用细菌而用蛋白 A-Sepharose 来减少非特异蛋白质的结合。用上述任一方法纯化后，在含有 SDS 的样品缓冲液中加热溶解免疫复合物并进行 SDS-PAGE。由抗体专一性地沉淀的多肽，可借助接种免疫前的血清对照样品在同一板胶的另一样品池中电泳的结果来鉴定。多肽抗原电泳后的进一步鉴定可以与有关标准多肽比较来测定分子量，或者与纯化的抗原共同电泳。若研究的多肽的分子量相当于抗体轻链的分子量（约为 23,500）或重链的分子量（约为 50,000），则样品在解离时删去巯基试剂或用木瓜蛋白酶水解抗体，均能避免在 SDS-PAGE 上共同移动。

若沉淀的蛋白质抗原超过总蛋白质的 0.1% 时，这一方法的效果最好，虽然也成功地对低浓度的特异蛋白质进行了分析。这种方法更常用于：

(a) 用某种蛋白质激活的抗体所进行的免疫交叉反应和 SDS-PAGE，可以分析两种来源不同的蛋白质的相互关系。另一种做法是先进行 SDS-PAGE，然后对分离的蛋白区带作免疫交叉反应。

(b) 免疫沉淀后再进行 SDS-PAGE，是目前追踪特异蛋白质在体内或体外合成最常用的方法（如参考文献 [125]）。蛋白质用放射性氨基酸（通常为 [^{3}H]-亮氨酸或 [^{35}S]-蛋氨酸）标记，免疫沉淀并用 SDS-PAGE 分级分离。电泳后，切下特异的蛋白质区带并测定其放射性。免疫沉淀/SDS-PAGE 协同应用优于单纯免疫沉淀的主要点是，SDS-PAGE 可以将特异沉淀的蛋白质与参与免疫沉淀反应非特异的蛋白质分离开来，因而显著地降低了本底的计数。

(c) 本法也能用来分离微克数量的与免疫有关的蛋白质，供进一步分析。例如，Platt 等[126]利用 *E. coli* 乳酸阻遏物激活的抗体，分离出突变蛋白质，蛋白质的分析系通过N末端氨基酸的序列分析并与野生型相比较而加以证实。

矫作物及故障

(i) 不能聚合，通常是由于制备的试剂浓度不准确，或者凝胶混合液中漏加某一试剂，也可能是试剂不纯。最简单的补救办法通常是弃去溶液并用纯试剂配制一批新鲜溶液。高浓度的巯基试剂也能抑制聚合作用。

(ii) 按照本章所确定的时间过程，对于均一浓度的凝胶，聚合作用通常应在 10—30 分钟内发生。纠正聚合过快或过慢的最容易的方法是改变聚合催化剂的浓度。

(iii) 聚合时凝胶龟裂(通常只在高浓度凝胶上发生)，常常是由于聚合反应本身产生过量的热，这可以用冷溶液来补救。对于柱胶，使用硅烷化的玻璃管也可能有益。若柱状或板状凝胶逐一地制备，龟裂问题通常在大多数浓度的凝胶中不会遇到。电泳时凝胶发生龟裂，是由于输入的电流过大使凝胶过热所引起的，可以用较小的电流在较长的时间内电泳来弥补。

(iv) 若非解离缓冲液的离子强度浓度高到足以防止天然蛋白质发生凝聚，那么样品中的不溶性物质常为变性蛋白质，电泳前必然离心除去。在含 SDS 的缓冲液中样品不溶解，其原因是 SDS 浓度过低，还原剂数量不足或 pH 偏低，特别是在蛋白质用 TCA 沉淀后更是如此。

(v) 样品加到板胶的样品池中不能在槽的底部形成一层样品层，表明样品缓冲液中偶然遗漏了蔗糖或甘油，或者是由于样品梳的齿未能与玻璃板贴紧，结果凝胶在梳齿和玻璃板间聚合而影响载样。后一问题的补救法是用一个更适宜的样品梳，若时间不长可利用一只连接水泵的注射器针头，迅速从样品池中除去过量的凝胶。

(vi) 在电泳过程中板胶从玻璃板上脱落，通常是由于玻璃板不清洁；即便是在玻璃容器清洁的情况下，低浓度的凝胶有时也从管中脱落；在胶管的底部安装一层尼龙网即可防止凝胶的滑脱。

(vii) 有时在电泳过程中，柱胶的顶部向内收缩且与管壁分离开来，结果引起凝胶变形和样品在凝胶和管壁之间的空间移动。在板胶上也观察到类似的现象，板胶样品池的底部向样品泳动的方向内陷。这两种现象都是由于在凝胶的表面存在着高分子量、高电荷量的物质，尤其是样品中含有高浓度的核酸时更是如此(低浓度凝胶常可耐受)。若遇到这类问题，可以用数种方法中的任何一种来降低核酸的浓度(见第 5 章)。

(viii) SDS-PAGE 的染色效果不佳，常常可以通过增加染色溶液体积将已有的 SDS 稀释来纠正。

(ix) 考马斯蓝染色后凝胶呈现金属光泽，通常是因为溶剂蒸发后使染料在凝胶的这一部位上干燥。脱色后凝胶的表面有时可观察到一薄层考马斯蓝膜，此时可以将凝胶浸入 50% 甲醇中快速洗涤，或者用甲醇浸泡的滤纸轻擦凝胶的表面将膜除去。

(x) 靠近凝胶边缘的蓝色污渍，通常是由于不戴手套操作凝胶所留下的指印。

(xi) 在板胶的样品轨迹或整个柱胶上观察到蛋白质区带，可能是由于样品缓冲液被污染。若污染贮液槽缓冲液，则整个凝胶其中包括板胶中未加样品的样品池均出现连续不断的染色区。

(xii) 某一柱胶或板胶样品轨迹在染色后其蛋白质区带界限不明显且染色后的本底

高，是由于样品蛋白质水解过度[补救方法见（xviii）]。然而，这类现象也可以在 SDS 试剂不纯的 SDS-不连续系统中观察到；同一样品用纯的 SDS 进行分析能获得清晰的区带。

（xiii）染色区带某些部位染色密度的不同，常常是由于凝胶表面参差不齐，使样品在电泳前积聚在较低的部位。粗心、覆盖凝胶无经验或凝胶聚合时振动，都能引起凝胶表面不平。

（xiv）蛋白质的主要部分不能进入分离胶，能引起凝胶起始点染色带加深。若凝胶浓度相当低，人们有理由预期蛋白质能进入凝胶基质，这一问题可能是由于电泳前样品中的蛋白质凝聚引起的[见前述（iv）]，或者是由于在非解离不连续缓冲系统中，电泳时在浓缩胶中形成高浓度的蛋白质区带而引起蛋白质沉淀。若属于后一情况，建议操作者应用连续缓冲系统和浓度较低的样品。

（xv）某一柱胶或板胶样品轨迹上分布蛋白质带且同时在凝胶的起始点有蛋白质，则表明蛋白质已沉淀且在随后的电泳过程中被溶解。纠正办法见上述（iv）及（xiv）。

（xvi）均一浓度的凝胶在真空干燥器中干燥时，遇下列情形之一则将出现碎裂。即凝胶在干燥到适宜的程度之前突然将干燥器打开；应用厚的板胶（＞1.5mm）或柱胶切片；在干燥前将凝胶膨胀。

（xvii）荧光显影时 X 射线胶片人为地显黑色，可能是由于 DMSO 除去不适当所致。对于后来的凝胶，在凝胶干燥前于水中应浸泡足够的时间。

（xviii）蛋白质区带图形重现性不佳，通常是由于样品制备所引起的，而与聚丙烯酰胺凝胶电泳无关。染色的颜色变淡或某一组分区带完全消失可能是由于蛋白质被水解。就象以前不能观察到快速泳动带的现象一样。在制备样品的过程中，低温操作及应用蛋白酶抑制剂能消除这类现象的发生，若在 SDS-PAGE 中出现这类问题，可以在解离时将样品至少加热到 90℃ 并维持二分钟来控制。

综合性参考文献

Gordon, A. H. (1975): 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶和淀粉凝胶电泳 (Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and Starch Gels;Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology; Work, T. S. and Work. E., eds; North-Holland, Amsterdam, Oxford, Vol. 1, pt. 1.)。

Smith, I, (ed) (1975): 层析和电泳技术，第 2 卷，区带电泳 (Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. 2. Zone Electrophoresis, William Heineman Medical Books Ltd., London.)。

Allen, R. C. and Maurer, H. R. (eds) (1974): 聚丙烯酰胺凝胶电泳及等电聚焦 (Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel, Walter de Gruyter, New York.)。

Maurer, H. R. (1971): 圆盘电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳的有关技术 (Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin and New York)。

第2章　“定量”和制备性的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Andreas Chrambach 和 David Rodbard

引　　言

聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）是目前能根据分子大小和净电荷多少这两种物理学差别来分离分子的唯一方法[1]。如果分子种类间的性质的差别不清楚，因而也不知道是利用它们的大小还是利用它们的电荷来分级分离是切实可行时，那么，此时可选用这种分离方法。在涉及蛋白质混合物的比较分析的众多应用之中，第1章叙述的技术就能满足需要。但是，只有几种成分时，通过精确测定最适孔径的大小（根据 Ferguson 曲线图分析法），使所研究的分子与其移动非常相近的杂质分离开来成为可能，聚丙烯酰胺凝胶电泳分析法提供了有关分子大小和电荷分离的信息或两者之一的信息，是极为有效的方法。

当人们试图用蛋白质的相对泳动率（R_f值）作为一种理化工具来测定蛋白质的大小和电荷，或测定最适孔径大小，以便将这一蛋白质与另一蛋白质分离时，必须使用具有能重复的凝胶。我们已设计出应用于特殊目的的聚丙烯酰胺凝胶电泳——“定量 PAGE”[1-3]。如象以前详细讨论过的那样[2]，人们严格控制试剂的纯度、单体和催化剂的浓度、抑制剂（氧）以及温度，使聚丙烯酰胺凝胶的聚合速度标准化，则聚丙烯酰胺凝胶是能够重复的。本章仅从这些方面来叙述凝胶的聚合过程。

从方法学上来看，PAGE 与 SDS-PAGE 的差别不大，因此除非文中另有说明，本文只叙述单纯的 PAGE 的方法，同时它也适用于 SDS-PAGE。

定量 PAGE 电泳仪概述

定量 PAGE 方法的主要操作是测定蛋白质的物理特性和确定将任何两种成分加以分离的最适分离胶的浓度（Topt），它需将这些成分在不同浓度的凝胶中同时电泳。满足这一要求，最好是采用凝胶管电泳仪。目前所用的 PAGE 管电泳的形式与 Ornstein 和 Davis 最初介绍的 PAGE 装置不同[4]，主要是通过下缓冲液贮液槽中的套层水来控制温度，这种电泳仪有一个塑料的或玻璃的杯子（上缓冲液贮液槽），在杯的底部有多个中空的橡皮圈，装有凝胶的玻璃管安置在这些橡皮圈中，凝胶管的一端伸进第二个杯中（即下缓冲液贮液槽），而另一端进入上缓冲液贮液槽，这种装置提供了带有橡皮圈的内径分别为0.3，0.6 和 1.8cm 的上缓冲液贮液槽，它有多种用途。通过维持下槽冷却剂的快速流动（1.5—3.5 L/min）及下槽缓冲液连续不断地电磁搅拌能进一步增强聚合和电泳时的散热效率。还有垂直水平装置，安全连接装置及冷凝液排除器，也较方便[2]。为保证带有套层水的 PAGE 柱电泳仪（图1，RND Optical Systems 公司，以硬质玻璃制造的成品）也适用于机械性能不佳的凝胶，下面介绍设计和操作上的特点。

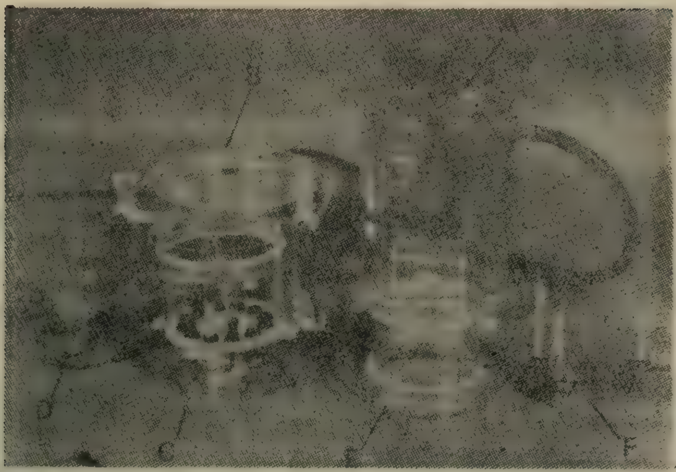


图1 柱凝胶电泳装置。A，下缓冲液贮液槽；B，带有冷凝液排出管和垂直安置仪器的螺旋调节器，C，用于内径为 0.6cm 的凝胶管的上缓冲液贮液槽，类似的用于内径为 0.3 和 1.8cm 凝胶管的贮液槽也是仪器的一部分；D，带有上、下电极的电极盖和安全连接装置；E，和F，类似的用于板凝胶的上缓冲液贮液槽和电极盖(倒放着的位置)。A至D的工艺图供索取。

(i) 凝胶管的静力平衡　将上缓冲液贮液槽放置在下缓冲液贮液槽上，两槽内阳极和阴极缓冲液量相等。

(ii) 聚合温度和电泳温度相同　目的是防止凝胶的热膨胀和收缩或其中之一发生改变而产生的器壁粘着力减小。在电泳仪中，是在操作的温度下聚合凝胶以达到温度平衡。通常蛋白质在 0—4℃时进行 PAGE，以保持蛋白质的天然性质。SDS-PAGE 也在低温(5℃)进行，它不是为了防止变性(在烷基磺酸钠去污剂存在下必定完全变性)，而是为了提高以 R_f 的变化所反映出的聚合作用的重复性[5]。

(iii) 凝胶的机械支持物　在聚合和除去凝胶管的支持物蜡膜后，凝胶管底部放一块方形尼龙网(100μm 目较宜)，再用一内径为 8mm、长 2—3mm 的 Tygon 管子套在凝胶管外将尼龙网固定，不宜用透析袋代替，因为在局部产生较大的电压降，而引起凝胶管底部发热。

(iv) 使玻璃表面极性最大，以利于亲水性聚丙烯酰胺粘着　用氢氧化钾的甲醇溶液或重铬酸钾清洁液浸泡凝胶管，再用水洗至中性。要注意的是，如用去污剂洗涤，则得到相反的效果。

(v) 凝胶管涂布　如用机械性能不稳定凝胶进行 PAGE，则以线状的 1% 聚丙烯酰胺 (Gelamide 250, Union Carbide 或 Polyscience) 涂布凝胶管。

迄今三种最新型号的管凝胶电泳仪(即 RND Optical, Miles 和 Hoefer Scientific)中，Mile 生产的装置是最经济的一种型号，尽管它仍然缺乏价格较贵的全套硬质玻璃制成的电泳仪的某些性能，例如有可互换的用于各种直径的柱胶或用于板胶的上缓冲液贮液槽，与盖相连的水平仪及带直立螺旋的仪器底座，两者用于调节凝胶管的垂直和收集器壁流下的冷凝水。其中有些特点已用于 Hoefer Instrument 制造的仪器中；但在设计上还存在一些问题，要在 0—2℃操作，需要一个—7℃的冷浴，而且安装橡皮圈的平板太薄，当插入或取出凝胶管时很易将橡皮圈拔脱，在实验过程中取出凝胶管时须将冷凝管断开(除非

不加仪器盖)，最后，还缺少水平装置和仪器底座(见上)。

RND Optical Systems 有一种用玻璃制成的特殊的凝胶柱电泳仪，它有一组六个或八个隔开的上、下缓冲液小槽，可在不同的 pH、离子强度(见下)，还原剂浓度、辅助因素等几种缓冲液系统中，同时进行凝胶电泳。或可将有机玻璃圆筒粘连在有机玻璃的上、下缓冲液槽中而制成[6]。但在这种电泳仪中，未考虑凝胶静力平衡的性质。可是由于增加了凝胶长度，约为 20cm，因而提高了凝胶的机械稳定性。见参考文献 [7] 的图 5 描绘的硬质玻璃单元装置。

在三种特殊的情况下，若样品体积小，直立板状凝胶装置(即 hoefer scientific) 较方便。

(i) 在最适凝胶浓度下比较不同样品中蛋白质泳动距离或 R_f 值。由于是在同一块凝胶板上直接进行比较，就像单一试验一样，避免了“实验之间”的误差[8]。但是，如根据泳动距离比较区带，则要求所有轨道上样品的离子强度、缓冲液成分、样品体积、凝胶的确切厚度及器壁粘着力都必须相同，以避免不同轨道之间的电压差异。

(ii) 若蛋白质分子量的范围限制到足以容许人们在孔径较小的范围内分析全部的蛋白质，则采用垂直板电泳仪制作同时具有数量众多的标准分子量的蛋白质的 Ferguson 曲线图也是方便的。

(iii) 最后，垂直板电泳仪也适用于在均一凝胶浓度下进行 SDS-PAGE，以便根据分子的大小来区别蛋白质的亚基。

水平板电泳仪(如 LKB 或 Pharmacia) 局限在用于连续缓冲系统中，这是由于它不适用于类似的相邻接的浓缩胶和分离胶的聚合。因此，一般说来，它不用于不连续缓冲系统的 PAGE。但在各种型式的电泳仪中，水平板电泳仪提供的机械稳定性确实最好，因此有时对极大的分子或颗粒进行 PAGE 时，所用凝胶为机械性能不稳定的、以 10—50% 双丙烯酰胺交联的聚丙烯酰胺凝胶[9]，或琼脂糖，则水平板电泳仪便具有某种优点。

凝 胶 的 选 择

可制成单体总浓度在 3.5—40% 范围内的聚丙烯酰胺凝胶，此类凝胶具有能阻滞大多数蛋白质电泳移动的有效孔径[1]。当以双丙烯酰胺为交联剂，其浓度(% C)由 2% 增大到 5% 时，分子筛孔径减小，而% C 更大时，分子筛孔径亦渐渐增大，到达 50% 时，便不再表现出分子筛效应[9]。但由于双丙烯酰胺浓度增大，凝胶的机械稳定性降低，所以实际上(在 0—4℃分离时)宜于用其它交联剂，特别是 N，N′-双丙烯基酒石酸二酰胺 (DATD)[10] 代替双丙烯酰胺，或者如有可能，在很大的孔径时，可用琼脂糖代替聚丙烯酰胺。DATD 交联的聚丙烯酰胺凝胶，当 C 大于 10% 时，有效孔径不随%C 的增大而增大，因此，等 mol 浓度交联的凝胶，在 T 为 10% 以上时，其阻滞性要比双丙烯酰胺交联的凝胶大。此外，DATD 交联的凝胶的平均链长减短，未聚合的交联剂的量也减少，这种未聚合的交联剂的量随链长的增长而增多。这些性质说明，DATD 凝胶很可能具有较大的弹性、机械稳定性和对玻璃壁的粘着力的优点[10]。

在几乎所有 PAGE 工作中，丙烯酰胺、双丙烯酰胺、过硫酸盐、核黄素和 TEMED 仍然是实用的试剂。这些试剂容许人们在任何实用的 pH、离子强度和温度下，在上述大的

浓度范围内于 10 分钟内聚合。据此,我们将专门讨论这些试剂,虽然有其它一些未经试验或偶尔使用的单体、交联剂和聚合催化剂可能会提供目前尚未了解的小孔径结构的分离知识,其中有几种试剂已经讨论过[1,3,5]。

实验发现,在 10±2 分钟内聚合用于分析的聚丙烯酰胺凝胶(直径 0.6cm),其单体转化成聚合物的程度最高,且平均链长最长。凝胶的这两种特性是互相矛盾的:即聚合催化剂的浓度增大,则聚合的百分数也增高,但平均链长却缩短。因此,事实上,人们应使用能在十分钟内引起聚合的催化剂的最低浓度。从少数资料来看[5],选择这些浓度时,三种自由基的供体/受体:过硫酸盐、核黄素和 TEMED 似乎是可以任意变换。在碱性条件下过硫酸盐效果较好,而在中性和酸性时核黄素较好。如果使用三种而不是两种试剂,就能较好地控制聚合反应,因此,通常是在过硫酸盐存在下应用核黄素进行光聚合作用[2,5]。

在聚丙烯酰胺聚合过程中,应注意系统中潜在的自由基供体或受体,并相应改变三种标准聚合催化剂浓度,以满足补偿潜在的自由基的需要。氧是无处不有的自由基捕获剂,而且偏酸时的作用方式也相似。胺类类似于 TEMED,可加速聚合作用。制做仪器的材料,如软玻璃和塑料,起抑制剂作用,而橡胶似乎有聚合催化剂的性质[2],只要这些因素保持不变,就可忽略这些因素;对于直径 0.6cm 的凝胶在 10 分钟内聚合,仍具有重复性。

如欲制备能重复的凝胶,“十分钟规则”特别重要。这是因为单体转化为聚合物的百分数越低,则根据 R_f 测得的孔径的可重复性越小[5]。看来,孔径大小的变化与平均链长有关,因为在 0—4℃形成的“十分钟凝胶”,其 R_f 值的重复性比 25℃时形成的凝胶要好。

在三种情况下应用 PAGE,其凝胶的聚合与孔径的可重复性无关:

(i) 浓缩胶、等速电泳(第 3 章)或等电聚焦电泳(第 4 章)中所需的“非排阻性”凝胶:只要这些凝胶不明显地阻滞所研究的蛋白质,那么它与凝胶的实际浓度无关。

(ii) SDS-PAGE:只要研究系统中所有蛋白质,未知的及标准的享有相同表面电荷密度(Ferguson 曲线图上的 Y_0 值,见下文),只要标准分子量蛋白质及未知物在同一凝胶浓度下进行 SDS-PAGE,那么在一个较宽的范围内与平均孔径的大小无关。

(iii) 在同一凝胶上比较许多蛋白质的泳动距离时:在此情况下,显然不能确定“最适孔径”(Topt),而不得不以“平均孔径”所代替(见下文)。

缓冲系统的选择

不连续的和连续的区带电泳

蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳可用连续的或不连续(多相)的缓冲系统进行。不连续缓冲系统的 PAGE(多相区带电泳,MZE)较单一的连续缓冲系统的 PAGE(连续区带电泳,CZE)的主要优点是能将样品在分离前就浓缩成狭窄的起始区带。这是由于形成了泳动界面的缘故。

混合物中含有移动较快的带电部分(先导成分)和移动较慢的部分(后续成分),它们在施加的电场下形成泳动界面。实际上泳动界面迅速形成是由于首先由静态的相界面将两种成分分离,再由密度差异来稳定。例如使含后续成分的上层液相和含先导成分的下凝胶相得以分离(图 2),系统中一旦施加了电场,由于极性使先导成分在后续成分之前移动,于是便形成了泳动界面。达稳定态时其特点是先导成分、后续成分和中间的带电成

分移动的速度相等，而且这些成分在泳动界面内按先后次序排列，泳动界面不仅由移动着的各成分的速度“控制”，而且也与电压、pH、温度和整个泳动界面之内的蛋白质浓度有关。

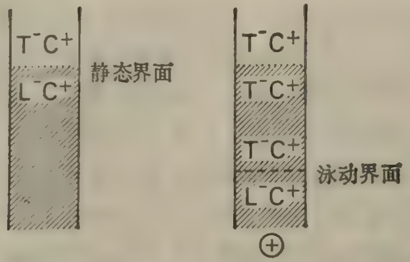


图 2　在电场作用下通过带电的先导成分（L）和后续成分（T）的泳动界面；向阳极移动。C代表共同的成分。影线表示较介质（图中为空白）密集的介质（凝胶）。实线代表凝胶管，虚线代表泳动界面，点线表示为静态界面。左图：电泳前。右图：在电场作用下。

依据这一现象将所研究的蛋白质或是在泳动界面内浓缩（“选择性堆积”），而另一些（“未堆积”）蛋白质则保留在堆积区之外，或者是将其选择性地排阻在堆积区之外，而杂质则限制在泳动界面内，这种现象称之为稳态堆积(SSS)。一般说来，在分析生物材料时，利用稳态堆积蛋白质样品，其浓度极为重要，因此，我们将在此专门讨论与 MZE 有关的 PAGE。但是，如果是浓度高的样品，每毫升含蛋白质达 1mg 或超过 1mg，并且应用这一浓度和在离子强度很低（小于 0.01mol/L）时进行电泳，人们将选用 CZE，因为在此条件下 CZE 起始区带的宽度和分辨力与 MZE 没有明显的差别[12]。

多相的和单一的缓冲液的 PAGE 之间的其它区别很小。MZE 中最适 pH 用于分析每一凝胶中单一的区带，或者分析每一凝胶切片的活性；而 CZE 则必须分析不同 pH 时的全部凝胶。MZE 的一个明显的缺点是选择缓冲系统需要计算机输出，并掌握一些原理和专门术语及利用某些不常用的缓冲液[7]。 就计算 R_f 值的参考区带带宽说来，CZE 和 MZE 之间也略有不同：在 MZE 中，这种区带是泳动界面，它能使蛋白质和示踪染料或其中之一浓缩成极清晰区带，并保持清晰的程度，而与移动距离无关。但在 CZE 中，染料的区带更宽，并随移动距离的增大而加宽。因在 CZE 中，R_f 值的确定与染料的泳动距离有关，这种较宽的参考区带常常对 R_f 值引入较大误差。

可供选择的不连续缓冲系统：Jovin 输出

Jovin[13] 和 Everaets[14] 从理论上将泳动界面分为两种目前尚不能互换的科学语言，他们的理论已编入计算机程序。Jovin 程序已用于编制详细的缓冲系统输出（“Jovin 输出”），它详尽地描述了在各种 pH 状态下泳动界面的物理性质。“Jovin 输出”由国家技术情报服务处（NTIS）标定了价格，编在缩微胶片上（公开牌号 258309—259312），并附带目录（编号 196090），它罗列了四千多种能建立泳动界面的缓冲系统的主要性质。

相反，Routs 的 Everaets 理论程序尚未设计出一本描述稳态泳动界面的缓冲系统配方的小册子；也未详细列出各种缓冲液的物理性质。至今至多用于液相中分子量小的化合物和 Everaets 首创的毛细管装置中[14]。它与 Jovin 装置相比，有其优点，可用于计算各组连续的泳动界面，其中每一组都能提供理想的移动范围，即对单一蛋白质或一组泳动率

相似的蛋白质提供选择性的“移动间隔”。近来 Svendsen 提出了图解法，用于蛋白质分级分离的连续泳动界面[15]，但其程序和某些实验应用尚未发表，这里不予讨论。

表 1　Jovin 输出专门术语

成分 (Constituents)	相 (PHASE) 指令组 (As Set)	工作 (Operative)	功能 (Function)	堆积界限 (Stacking Limits)
(1) = 后续成分	ALPHA, α=(1)		上缓冲液	下，RM(1, ZETA)
(2) = 先导成分	BETA, β=(2)	ZETA, ζ=(4)	上凝胶缓冲液 (浓缩胶)	上，RM(2, BETA)
(3) = 先导成分	GAMMA, γ =(3)	PI, π=(9)	下凝胶缓冲液 (分离胶)	下，RM(1, PI)
(6) = 共同成分	EPSILON, ε =(11)		下缓冲液	上，RM(2, LAMBDA)

系统号		成分 1 2 3 6	pH (4) 范围	pH (2) 范围	pH (9) 范围	pH (3) 范围	RM (1, 4) 范围	RM (2, 2) 范围	RM (1, 9) 范围
JOV	2049	35 18 18 83	6.00	4.79	7.50	6.04	-0.123	-0.42	-0.41
			4.41/ 9.41	4.10/ 9.22	4.41/ 9.41	4.10/ 9.22	-0.004/-0.44	-0.28/-0.79	-0.004/-0.44
JOV	2050	35 19 19 83	6.00	4.77	7.50	6.09	-0.123	-0.28	-0.41
			4.41/ 9.41	4.40/ 9.29	4.41/ 9.41	4.40/ 9.29	-0.004/-0.44	-0.15/-0.63	-0.004/-0.44
JOV	2051	36 84 99 5	6.78	4.28	7.50	7.01	-0.102	-1.28	-0.28
			6.78/ 8.15	3.91/ 7.87	6.78/ 8.15	3.87/ 7.84	-0.101/-0.41	-1.28/-1.28	-0.101/-0.48
JOV	2052	36 15 99 5	6.63	4.13	7.50	7.01	-0.077	-0.44	-0.28
			5.34/ 8.13	3.19/ 7.98	6.89/ 8.13	5.66/ 7.82	-0.005/-0.40	-0.12/-0.66	-0.122/-0.40
JOV	2053	36 10 18 97	6.00	4.45	7.50	5.14	-0.021	-0.27	-0.28

图 3　Jovin 输出目录 (NTIS PB No. 196096) 中有代表性的一页。相的选定见表 1。

日期 = 03/26/70　　电子计算机系统号 = JOV-CHR 2052

极性 = -（向阳极移动）　　温度 = 0 ℃

CONSTIT 成分 1 = NO. 36 ; N-2-乙酰氨基-2-氨乙基磺酸
CONSTIT 成分 2 = NO. 15 ; 乳酸
CONSTIT 成分 3 = NO. 99 ; 氯化物
CONSTIT 成分 6 = NO. 5 ; 4-甲基吡啶

相	α (1)	ε (4)	β (2)	π (9)	λ (8)	γ (3)
C1	0.0400	0.0400		0.0254		
C2			0.0484		0.0307	
C3						0.0443
C6	0.0240	0.0240	0.0323	0.3075	0.3128	0.3264
θ	0.599	0.599	0.669	12.116	10.191	7.361
φ (1)	0.164	0.164		0.591		
φ (2)			0.663		1.000	
φ (3)						1.000
φ (6)	0.274	0.274	0.992	0.049	0.098	0.136
RM(1)	-0.077	-0.077		-0.278		
RM(2)			-0.438		-0.660	
RM(3)						-1.626
RM(6)	0.195	0.195	0.704	0.035	0.070	0.096
PH	6.63	6.63	4.13	7.50	7.17	7.01
离子强度	0.0066	0.0066	0.0321	0.0150	0.0307	0.0443
σ	0.748	0.748	4.241	1.708	4.056	9.997
K	189.	189.	1004.	418.	962.	2333.
υ	-0.103	-0.103	-0.103	-0.163	-0.163	-0.163
E	0.024	0.024	0.026	0.047	0.064	0.088

图 4　代表性的缓冲系统 No. 2052 的物理性质，Jovin 输出描述的每一缓冲系统的第 2 页上所提供的形式。

因此，本章仅限于 Jovin 理论的语言和“Jovin 输出”的格式。表 1 概述有关的专门术语。图 3—7 描述了一种代表性的“多相”缓冲系统，编号 2052 的“Jovin 输出”。由于有多行数字、许多符号和希腊字母，图表和表格显得杂乱，然而，如果读者接着读下去，那么，他将逐步掌握迷惑人的符号，并觉察到在这些图表中实际上只有很少的几个参数和符号，读完本章后，读者就会熟悉它们。

PHASES ZETA(4)、BETA(2)、GAMMA(3)、PI(9) 的缓冲液配方

ξ（4），β（2），γ（3），π（9）相缓冲液配方

成分		1倍于4相	4倍于2相	4倍于3相	4倍于9相
N-2-乙酰氨基-2-氨乙基磺酸	克	7.29			1:85
乳酸	克		1.74		
1N	毫升			17.74	
4-甲基吡啶	克	2.23	1.20	12.16	11.45
水加至		1升	100毫升	100毫升	100毫升
终浓度=pH（25℃）		6.27	4.09	6.86	7.25
K（25℃）		523.	1964.	4387.	1043.

图 5　代表性的缓冲系统 No. 2052 缓冲系统的配方，Jovin 输出描述的每一缓冲系统所提供的形式。

堆积和不堆积范围

ξ(4)或π(9)相					PHASE β（2）或λ（8）相					γ（3）相		
RM(1)	φ（1）	C(1)	C(6)	PH	RM(2)	φ（2）	C(2)	C(6)	PH	C(3)	C(6)	PH
-0.005	0.010	0.0400	0.0005	5.34	-0.12	0.182	0.0484	0.0088	3.19	0.0	0.0	0.0
-0.020	0.060	0.0400	0.0045	6.15	-0.17	0.265	0.0484	0.0128	3.40	0.0	0.0	0.0
-0.052	0.110	0.0400	0.0117	6.43	-0.27	0.415	0.0484	0.0201	3.69	0.0	0.0	0.0
-0.075	0.160	0.0400	0.0228	6.62	-0.42	0.641	0.0484	0.0312	4.09	0.0	0.0	0.0
-0.099	0.210	0.0400	0.0385	6.76	-0.61	0.923	0.0484	0.0469	4.92	0.0	0.0	0.0
-0.122	0.260	0.0400	0.0597	6.89	-0.65	0.990	0.0484	0.0681	5.83	0.1008	0.1292	5.66
-0.146	0.310	0.0400	0.0876	6.99	-0.66	0.996	0.0484	0.0959	6.21	0.0846	0.1421	6.04
-0.169	0.360	0.0400	0.1237	7.09	-0.66	0.998	0.0484	0.1320	6.45	0.0728	0.1600	6.29
-0.193	0.410	0.0400	0.1701	7.18	-0.66	0.998	0.0484	0.1785	6.64	0.0639	0.1830	6.48
-0.216	0.460	0.0400	0.2298	7.27	-0.66	0.999	0.0484	0.2382	6.80	0.0570	0.2117	6.64
-0.240	0.510	0.0400	0.3068	7.36	-0.66	0.999	0.0484	0.3152	6.95	0.0514	0.2476	6.79
-0.263	0.560	0.0400	0.4078	7.44	-0.66	0.999	0.0484	0.4154	7.09	0.0468	0.2925	6.93
-0.287	0.610	0.0400	0.5392	7.53	-0.66	1.000	0.0484	0.5476	7.22	0.0430	0.3499	7.06
-0.310	0.660	0.0400	0.7177	7.63	-0.66	1.000	0.0484	0.7261	7.36	0.0397	0.4248	7.20
-0.334	0.710	0.0400	0.9663	7.73	-0.66	1.000	0.0484	0.9747	7.49	0.0369	0.5262	7.33
-0.357	0.760	0.0400	1.3290	7.84	-0.66	1.000	0.0484	1.3374	7.64	0.0345	0.6705	7.48
-0.381	0.810	0.0400	1.8957	7.97	-0.66	1.000	0.0484	1.9040	7.79	0.0324	0.8914	7.63
-0.404	0.860	0.0400	2.8849	8.13	-0.66	1.000	0.0484	2.8933	7.98	0.0305	1.2710	7.82

图 6　代表性的缓冲系统 No. 2052 的缓冲子系统表，Jovin 输出描述的每一缓冲系统的第 3 页上提供的形式。

再堆积参数

ψ（5）相							τ（6）相				
CT7	IS	RM(7)	φ（7）	C(7)	C(6)	PH	C(7)	C(6)	PH	φ（7）	K
23	0.009	-0.154	0.376	0.0233	0.3054	7.74	0.0368	0.0207	6.94	0.088	90.
24	0.008	-0.126	0.451	0.0180	0.3001	7.77	0.0284	0.0124	6.82	0.086	60.
25	0.004	-0.070	0.219	0.0198	0.3019	8.05	0.0312	0.0152	7.24	0.042	34.

图 7　代表性的缓冲系统 No. 2052 再堆积缓冲液表，Jovin 输出描述的每一缓冲系统的第 3 页上提供的形式。

定量 PAGE 方法

策略

因为 PAGE 是基于分子大小和净电荷多少来分离分子的，所以分离时选择最适的电泳 pH 和聚丙烯酰胺孔径是合理的。又因为在不连续缓冲系统中，PAGE 的 pH 与离子

强度和其它参数对天然蛋白质的稳定性十分重要，它们能够借助利用每一条件下的单一凝胶，评价各区带或凝胶切片（堆积区）的结果而达到尽可能完善。孔径大小的最佳化则需要分析众多的凝胶和每一凝胶中的许多切片，故在 PAGE 分级分离的起始步骤时就使 pH 最佳化[2,7]，随后选择最适孔径，这种做法是省力的。一旦对特定的分离选择出最适 pH 和孔径，就能有效地进行分析性的和制备性的 PAGE。

至今，预测分离最适 pH 的方法是根据分子的净电荷(“电荷分级分离”)，其理由是欲分离的大分子所带净电荷越少，则相对的净电荷差异就越大，“电荷分级分离”就越有效。为此，进行系统研究以测定能使所研究的蛋白质阴离子堆积的最小 pH 和蛋白质阳离子堆积的最大 pH。这种系统研究可在一次实验或少数几次实验中完成，它取决于如何精确地选择分离时所需要的 pH。对于在最适 pH 或接近最适 pH 时对蛋白质稳定性极为重要的其它参数，如离子强度、电泳温度、凝胶氧化还原条件、掺入到凝胶中的金属离子、络合剂或去污剂的最适条件，最好在浓缩胶中进行选择，这是由于在相同的最适条件下浓缩胶比分离胶有更多的优点，即对于每一种特定的研究条件仅需分析一个凝胶切片。如使用内部分室的凝胶柱电泳仪[6]，由于有相当数量的小室，故能在一次实验中研究各种不同的条件，可以在数个工作日内对各有关条件作大致的了解。

最适 pH

步骤 1：选择在理想 pH 范围内使泳动界面缓慢出现的缓冲系统

系统目录（NTIS PB 编号 196090）用于选择理想的堆积 pH［表 1 中的 pH（ZETA）或图 3 中的 pH(4)］。在查看目录中 pH(4) 的数值（图 3，第 7 行)时，在每个 pH(4) 值下用斜线(/)隔开的两个数值表示的 pH(4) 值的可能“RANGE”暂时不考虑。

目录中列出了缓冲系统的编号。带正电荷的蛋白质在 0℃ 时需查编号为 1—691 的缓冲系统；25℃时则查编号 692-1578。带负电荷蛋白质在 0℃时应查编号为 1579—2969 的缓冲系统，25℃时则查 2970—4269。因此，人们应在这四种范围内选择所需要的“象限”，并开始读下 pH(4) 行的 pH 的最大和最小值，以便确定 SYSTEM NO 的编号(图 3 的第 1—2 行)，它是根据合理的 pH(4) 来确定的，pH(4) 不仅指出了下堆积限的界限［图 3 的第 11 行 RM(1，ZETA) 或 RM(1，4)］，而且也指明了某些有希望的缓冲剂（图 3 第 3—6 行成分“CONSTITUENTS”项)。

同时标明“下堆积界限”的 RM(1，ZETA) 值表示与 Na^+(RM) 有关的“组分泳动率”，即后续缓冲液（表 1 的 CONSTITUENT 1）呈现在操作堆积相（即 PHASE 4 或 ZETA）之中。组分泳动率是带电部分的泳动率，它随总浓度中相应的带电的和不带电的部分的 mol 数的增加而增大。实际上，RM(1，ZETA) 值表示的是蛋白质在特定的泳动界面内堆积的最小泳动率，这时应使用 RM(1，ZETA) 数值小的系统，因为它容许所研究的蛋白质在泳动速度减慢的同时，也就是说接近其等电点进行堆积。RM (1，ZETA) 的“低值”为 0.050 左右。pH 距等电点越远，蛋白蛋堆积的 RM(1，ZETA) 值可能也越大。因此，为了选择目录中适宜的 pH 系统，应该同时观察图 3 中的第 7 和 11 行。在进行这种考查时将注意到很少遇到 RM(1，4) 值小的系统。一些这样的缓冲系统已在文献中列出（参考文献[7] 的图 8，参考文献[2]的附录 C 及参考文献 [16] 的附录 1 的上凝胶缓冲液)。但在所列出的缓冲系统中，绝大多数给出的泳动界面具有较宽的泳动率范围［RM (2，BETA)—

RM (1,ZETA)],因此堆积区的 pH 梯度变化急剧,在堆积区中缺少缓冲能力。Jovin 程序(Newby, A. C 等,在编制中)能获得在堆积区中具有更强的缓冲能力的系统,它在运用典型的"Jovin 输出"的同时，利用数量有限的缓冲成分(这类缓冲成分列于参考文献 [2] 的图 6，参考文献 [17] 的图 4 及缓冲系统目录的首页上)。 一旦已知其 *pK* 值和离子泳动率的缓冲剂成分数量增加,则有更多的这类系统可供选用。

假如我们在缓冲系统中所选择的 pH 内不能查出具有 RM (1，ZETA) 数值很小的缓冲系统,此时可能需要查阅已有编号的缓冲系统的子系统。图 3 第 11 行各 RM(1，4) 数值之下所列出的 RM(1,4)范围 "RM(1,4)RANGE" 指出 RM(1,ZETA) 可能的最低值,它可以由针对每个系统特征的四种缓冲成分(图 3 第 3—6 行)制得。然而，相应于 RM (1，4)RANGE (图 3 第 11 行)的 pH(4) RANGE (图 3 第 7 行) 给出的 RM (1，ZETA) 的最小值往往是不理想的 pH(ZETA) 值。因此实际上，合理的数值应选择在 RM(1, ZETA) 和 pH(ZETA) 数值之间。但目录上查不出这一折衷的数值，因为它只列出了 RM(1，4) 和 pH(4) 的最小值和最大值,并无这些参数的中间值,因而不得不求助于 Jovin 输出第 3 页上的每一系统(图 6 第 1 和 5 行)，它记录在 NTIS 的缩微胶片上。在选择 RM(1,ZETA) 时需注意这一事实,即随着 RM(1,ZETA)减小的同时,上堆积界限 RM(2,BETA)(图 6 第 6 行)也随之减少,它可能减小到使混合物中各蛋白质不能堆积的程度,即是说，其成分中的一部分的泳动率可能超过 RM(2，BETA),因此,为达到合适的堆积限定范围,人们必须使 RM(1,ZETA) 的数值大于所要求的最小值。

为了明确地选择"Jovin 输出"中任何系统的"子系统"，将采用某些术语[2]。以阿拉伯数字表示通过 PHASE BETA 和 PHASE ZETA 泳动界面的"子系统",每一系统依次列在输出的第 3 页上 (图 6 从上至下)。图 6 例子表明，RM(1，4) 值为－0.122 的 MZE 缓冲系统 2052 的子系统应标明为 2056.6[1)]。

SDS-多肽复合物的堆积容许有较高的下堆积界限 [RM(1,ZETA) 或 RM(1, PI)]。这是因为 SDS-多肽复合物的净电荷由于结合带负电荷的去污剂而显著增高。 SDS-多肽复合物在 pH ＞ 7 时,一个有代表性的下堆积界限 [RM(1,ZETA) 为 0.2][11]。

在许多情况下，有几种缓冲系统能在欲获得的 pH 条件下工作，并且能提供 RM(1，ZETA) 的低值。为了在其中进行选择，要考虑目录(图 3) 中第 3、4 和 6 行的缓冲成分 CONSTITUENTS 1、2 和 6，亦即每个系统的后续成分、先导成分和共同成分的性质：缓冲能力 [pH(ZETA) 到 *pK* 的近似程度]、溶解度、光学性质、对蛋白质活性的相容性、纯品的商品来源以及价格。

步骤 2：缓冲液的制备

为了从实验上测定使阴离子蛋白质堆积的最小 pH (或使阳离子蛋白质堆积的最大 pH)，对每种选定的缓冲系统必须制备其浓缩胶缓冲液 ("上凝胶"缓冲液)、阴极缓冲液和阳极缓冲液 ("上" 和 "下" 缓冲液)。 Jovin 输出的第 2 页给出了每种系统的"配方"

---

1) 同样，LAMBDA 相和 PI 相泳动界面的子系统依照它们在图 6 PHASE GAMMA 行的垂直出现的顺序 (第 11—13 行)用罗马数字表示。因此，RM(1,9) = 0.122 的系统应标明为 2052.0.1. 除非 Jovin 输出第 2 页上显示的数值变化而同时改变了 RM(1，4) 的值。虽然多数计算出的 PI/LAMBDA 界面显示高的 RM(I,PI) 值,但在 PHASE PI 和 PHASE ZETA 时蛋白质仍能堆积,即看来好象不堆积,然而并非不能堆积蛋白质。

(“RECIPE”)(图 5)，它详细列出了浓缩胶缓冲液的成分(PHASE2 浓度的 4 倍)和上缓冲液成分(按常规制备，同 PHASE4)[1]。上缓冲液由适宜于所研究的蛋白质的 pH、任意浓度的 CONSTITUENT 1 和 6 组成(表 1)。这对于防止样品在电源接通前的短暂时间内上缓冲液接触并进入密度稳定的样品相界面而引起变性是重要的。同样，下缓冲液成分中只要含有 CONSTITUENT 6，就不会影响蛋白质的性质。因为蛋白质不与下缓冲液接触，其 pH 也不受影响。CONSTITUENT 5 中的组成，如 K^+ 或 Cl^- 是任意确定的，它取决于系统的极性。也可使用其它的平衡离子，只要这种带电离子在通过凝胶时不产生电解产物即可。习惯上，在制备的下缓冲液内系统的通常成分为 0.0625mol/L (CONSTITUENT 6)和 0.05mol/L HCl (对阴离子蛋白质而言)或 0.05mol/L KOH (对阳离子蛋白质而言)。

为了制备特定子系统的上缓冲液，PHASE BETA 上两种缓冲液成分各自的最终的 mol 浓度，CONSTITUENT 2(C2) 和 CONSTITUENT 6(C6) 可从“Jovin 输出”第 3 页上每一系统的子系统表中查出(图 6 第 8 和 9 行)。所制备的上凝胶缓冲液为其终浓度的

聚丙烯酰胺凝胶系统 No. 2052

贮备液体积比		下凝胶 (GAMMA)		上凝胶 (BETA)		上缓冲液 (AIPHA)		下缓冲液 (EPSILON)	
		成分/100ml 贮备液	pH *K* 25℃ 稀释 4 倍	成分/100ml 贮备液	pH *K* 25℃ 稀释 4 倍	成分/升	pH *K* 25℃	成分/升	pH *K* 25℃
缓冲液	1	1NHCl 17.74ml 4-甲基吡啶 12.16g	6.86 4387	乳酸 1.74g 4-甲基吡啶 1.20g	4.09 1964	Aces 7.29g 4-甲基吡啶 2.23g	6.27 523	1NHCl 50.0ml 4-甲基吡啶 5.8g	5.46 4912
催化剂		KP mg RN mg		KP mg RN mg		PH(PI) = 7.50 PH(ZETA) = 6.63 RM(1,ZETA) = 0.077 RM(2,BETA) = 0.438 RM(1,PI) = 0.278 0℃(电泳时) = 0 Pa(聚合时) =1333.2 示踪染料 =			
单体溶液		%T a) 10.0 b) 20.0 c) 40.0		%T 6.25 %c 20					
		TD/100ml 凝胶 (μl) a) b) c)		TD/100ml 凝胶 (μl)					

图 8 利用 MZE 缓冲系统 No. 2052 获得的 PAGE 典型的操作指令表。因各实验室在某一%T、%c、pH 和离子强度下于 10 分钟内聚合的催化剂浓度各异，故表中未给出催化剂浓度。图中缩写：TD = TEMED，KP = 过硫酸钾，RN = 核黄素，*K* = 电导率 (μmhos/cm)。

1) “Jovin 输出”缓冲液配方上的上缓冲液成分按常规配制，其成分与 PHASE ALPHA 和 ZETA 相同这就消除了系统的静态界面。

4 倍，按常规此缓冲液是聚丙烯酰胺聚合混合物的四分之一(见图 8)。利用子系统时，可以利用对特定缓冲系统 RECIPE (图 5，PHASE4) 的上缓冲液，下缓冲液仍保持不变。

从"Jovin 输出"得到的系统其工作堆积相的离子强度各不相同。但是，为了比较各种堆积的 pH，确有必要令工作堆积相 (PHASE ZETA) 的离子强度彼此相等。各缓冲系统离子强度比较适宜的数值为 0.01mol/L。按照系统输出 (图 4) 第 2 页上 ION. STR (ZETA) 注明的数值，计算出工作离子强度为 0.01 所需的因数，再将此因数用在 4 倍于 PHASE2 (浓缩胶缓冲液)缓冲液 RECIPE 表的 CONATITUENT 2 和 6 (图 5) 中，即获得相等的离子强度，所以，列出的缓冲系统数值(参考文献 [7] 的图 8) 乘以必需的因数使离子强度为 0.01mol/L。但应注意，系统输出的第 2 页(图 4) 提供的各子系统(图 6) 的离子强度值只能由 Jovin 程序 (NTIS PB No. 196092) 计算出来。

步骤 3：浓缩胶的制备

浓缩胶只作为堆积时的抗对流介质。因为蛋白质的移动比形成泳动界面的缓冲液成分缓慢，因此，蛋白质在浓缩胶中就如同在能有效地减弱区带扩散的凝胶浓度中一样，其移动也不受阻滞，换句话说，凝胶应是抗对流的，又是"非排阻性的"。而且，它还应能很好地粘着在器壁上，因为缺乏这种器壁粘着性，电流就不能均匀地流过凝胶横截面，而主要是沿着凝胶与容器的内表面流动，结果引起区带几何形状的扭曲而降低分辨力。器壁分离严重时将导致蛋白质渗漏，或在凝胶与器壁之间移动。

在"开孔"凝胶介质中，Ornstein 最先使用的 MZE 中的聚丙烯酰胺[4] T 为 3.125%，C_{Bis} 为 20% 的凝胶，相比之下，它是非排阻性的。但机械稳定性和器壁粘着性不佳，除非象 PAGE 一样有牢固的分离胶支持。因此，T 为 5%，C_{DATD} 为 15% 的凝胶略有排阻性，但有良好的器壁粘着性和弹性，显然有利于我们利用浓缩胶对最适的电泳 pH 进行研究。与蛋白质分子量有函数关系的排阻程度用堆积的状况来衡量。任何蛋白质在特定的凝胶浓度下，能在泳动界面内移动(具有高的 pH 值和低的置换速度)可看成是"非排阻性"的[7,10]。第 3 章图 1 描述了非排阻性的以 15% DATD 交联的凝胶浓度[10]，它用于具有各种分子量的蛋白质。

对于待试的每一缓冲系统，需要有一台单独的 PAGE 电泳仪(图 1) 或在同一电泳仪中具有分隔的小室[6,7]。电泳仪通过从制冷恒温浴槽中以 0.5—3.5 L/min 的速度流过的循环冷却剂冷却到 0—4℃，并在此温下达到平衡。用三棱锉刀将外径 0.8cm、内径 0.6cm 的硬质玻管切成长 12.0cm 的小管子(避免玻璃屑进入管内)，用火小心地将管口烧制光滑，但不要使内径缩小，再以拉紧的蜡膜重复绕封管底，将所需数量的管子垂直地插入上缓冲液槽内中间有孔的橡皮圈中 (图 1)，上缓冲液槽内未放管子的孔用橡皮塞塞紧，然后将上缓冲液槽下降到下缓冲液槽的 2/3 处 (同上图，A)。如欲进行光聚合，则将电泳仪放置在两组装有 6 只 20W 的日光灯管中间，灯上附有二个半圆形的灯罩的仪器内 (Buchler 仪器)即可。

电泳仪内应装有足够量的下缓冲液，而上缓冲液槽内亦装有足够的上缓冲液，以使凝胶管浸在可控制温度的缓冲液内。下缓冲液应进行电磁搅拌，以散发聚合和通电时产生的热量。

上凝胶缓冲液为丙烯酰胺和交联剂 (T 10%，C_{DATD} 15%) 的贮备液。配制上凝胶缓

冲液和起始贮备液（常为 0.06% 过硫酸钾，2×10^{-3}% 核黄素，关于催化剂浓度的选择原则，见前文），并在冰中冷却（以便在 0℃聚合凝胶和电泳）、在放有小搅拌棒的 25ml 安瓿瓶中制备聚合混合物：将 5ml 丙烯酰胺-交联剂的贮备液。2.5ml 上凝胶缓冲液及 2.5ml 起始贮备液相混合（见图 8），立即放入在冰水浴上的真空器内（带电子真空控制器的真空泵），于 0℃脱气 5 分钟至 1333.22Pa（图 9，也见参考文献 [2,18]）。如果能提供具有能重复的氧分压，也能应用另一种部分脱气的方法，例如用流速恒定的氩气吹一定的时间[2]；而未加控制的真空泵或抽气泵脱气效果不能重复。

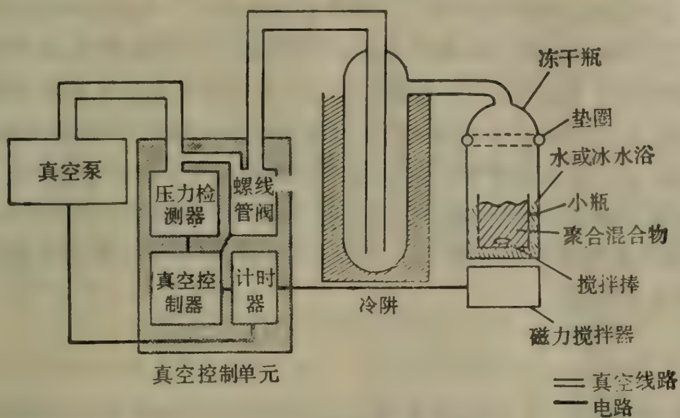


图 9　聚合混合物脱气装置示意图[18]。

最后加入聚合催化剂 TEMED（通常每 10ml 聚合混合物加入 5μl），混合物立即吸入至凝胶管中，此时不打开聚合用灯。用一支涂有润滑剂（lubriseal）的 1ml 玻璃注射器，装有 23 号 6cm 长的针头，或一支 100μl 的 Hamilton 注射器加水覆盖混合物，小心不要扰动凝胶表面。当凝胶上的水层有 1—2mm 高即可，打开聚合用灯，照射 30 分钟，然后倒转上缓冲液槽，使水层渐渐地吸在滤纸上，用锋利的单面刀片沿着玻管刮去封口的蜡膜，将装有凝胶管的上缓冲液槽放到下缓冲液槽中。

步骤 4：样品的制备

如欲电泳时将所研究的蛋白质与污染物堆积，并在分离胶中加以分离，而堆积的蛋白质用通常的 PAGE 染色法来检定的话，那么每根分析凝胶（内径 0.6cm）的蛋白质加样量为 5 至数百微克。若以测定活性或同位素分析法来检定蛋白质，则蛋白质加样量可低至检定方法能检定的限度。蛋白质的加样量不足微克量时，必须在样品中加入微克量的其它蛋白质，防止介质对蛋白质的非特异性吸附[19]。显然，加入的蛋白质其分子大小不受限制，但只要加入的蛋白质在选用的缓冲系统中与所研究的蛋白质带有相同的净电荷。通常选择的杂蛋白质在所研究的蛋白质之前移动，而杂蛋白质易于用凝胶过滤法从欲分离的蛋白质中去除。

通常用上缓冲液制备样品，其中含有足够量的蔗糖或甘油或其它不带电荷的粘稠的添加剂，以便在上缓冲液和样品相之间形成明显的相界面，同时还含有适宜的示踪染料，即这种带电荷的染料在上、下堆积的界限内移动。当先导成分（CONSTITUENT2）在选用的缓冲系统内为强酸或强碱时，从理论上分析，要求不用上缓冲液而用上凝胶缓冲液制备

样品。但是，上凝胶缓冲液的 pH(PHASE BETA) 常常不是偏酸就是偏碱，不适宜于保持蛋白质的活性，或与等电点太接近，易使蛋白质凝集或沉淀。假设示踪染料在特定的堆积界限内堆积，则它的区带界面狭窄，且不随移动距离增长而加宽。为了检验这一假设，必须证明，染料在凝胶中或者是在后续成分 (C1) 的前沿移动，或者是在先导成分 (C2) 的后沿移动，为此，宜用化学方法检测这些成分(见下)。

样品体积可与凝胶的体积相等。因此，实际上样品体积是不受限制的。但是，样品体积越大，蛋白质堆积所需的时间也越长。所以，真正限制样品体积的因素是凝胶的长度和为使蛋白质浓度达到稳态所需要的时间。如果样品体积小，每根分析凝胶加 200μl 或更少些，则用一支以润滑剂润滑的硬质注射器式的微量吸管控制器(微量化学特制品)通过非压缩性的微量吸管或 Hamilton 注射器 (100μl) 直接将样品溶液加在浓缩胶的顶端，这样，样品溶液很易在上缓冲液下铺成一层。如果样品体积较大，则将样品吸至凝胶的表面，随后覆盖缓冲液。这种覆盖易于进行而不扰动样品与上缓冲液之间的界面。方法是用巴斯德吸管将缓冲液加在清洁的凝胶管内壁上端，并沿管壁向下形成一连续细流。若玻管不干净，则缓冲液将聚结成小滴，滴下则冲坏界面。使用这二种方法覆盖时，必须注意在操作时保证不破坏界面。

步骤 5：电泳

为了尽快地达到稳态，人们应使用与电泳仪散热能力相适应的最高电压。如用直径为 0.6cm 的标准凝胶，蛋白质的加样量不超过 200μg，若凝胶按前述方法完全浸在 0—4℃ 不断搅拌的液体冷却剂(下缓冲液)中，可将电流控制在 1—2mA。

为达到稳态必须给以足够的堆积时间。对于分析性工作 (200μg 或更少)，可从染色蛋白质堆积的最大区带清晰的程度来辨别。实际上，如果样品体积小(少于 100μl/凝胶)，根据所观察到的示踪染料区带的清晰的程度就能合理地指导蛋白质堆积的时间。除了极慢的泳动界面 [RM(1, ZETA) 为 0.005—0.020 或 RM(2, ZETA) 为 0.1—0.2] 外，电泳时间通常 1—2 小时即已足够。

为了估价 pH 对堆积的影响，其它参数如离子强度、温度和电流密度必须相同，因此在一个多室的电泳仪中电泳是有益的[6]，但是，所有浓缩胶工作缓冲液 (PHASE ZETA) 的离子强度要相等，通常为 0.01mol/L (见上)。

步骤 6：浓缩胶分析

关闭电源后，用橡皮塞将管顶端塞紧，升起上缓冲液槽，将管子向下拉直至橡皮塞塞住管孔，这样分别取出不同 pH 值的浓缩胶。塞紧橡皮塞再继续电泳。用一只长 6cm 的 23 号皮下注射用的钝针头连到自来水龙头、虹吸管或注射器上，将水沿凝胶管湿润一圈，取出凝胶。因为浓缩胶属机械不稳定性胶，需将玻管垂直放在工作台面上 1—2cm 处，让水从注射器中滴出。连续的水流似乎会破坏凝胶。当针头从一端沿着凝胶的四周插入后，倒转凝胶管，并从另一端湿润凝胶，直到凝胶滑出到清洁的表面，如蜡膜上。

为了检查所研究的蛋白质在不同 pH 的胶中是否堆积，需要对堆积的状况加以识别。通常观察示踪染料。如高于或低于堆积的 pH 值，则示踪染料外观为一条清晰的有色特征区带，表示已堆积。当下堆积界限极低 (0.005—0.05)，且 pH 为中性，或其中情况

之一时，有时可用有色蛋白质，如血红蛋白、铁蛋白、细胞色素 c 来标明可见的泳动界面。若非此种情况，有时可根据后续成分 (C1) 和先导成分 (C2) 的专一性的沉淀来定位界面。例如磷酸盐用醋酸镧，硫酸盐用氯化钡，氯化物用硝酸银来沉淀。这时，将凝胶浸入沉淀剂的溶液中，用蘸有印度墨水的注射针头标出凝胶上清晰的沉淀界面。然后将同一凝胶进行蛋白质染色。最后，如果仍然不能了解蛋白质是否堆积，可使用等电聚焦中 pH 梯度测定法来测定整个凝胶的 pH（见第 4 章），将界面定位于 pH(BETA) 和 pH(ZETA) 之间的拐点上。

切下凝胶上堆积区带，混悬于测定的缓冲液中测定其活性。另一方法是，标记出与凝胶长度有关的堆积位置，将凝胶固定和染色。如果蛋白质已经堆积，则以染色显现的堆积位置呈现一条清晰的、微呈杏仁形的区带，与凝胶长度有关的堆积位置应和验证堆积的染料的位置相一致。如有怀疑，则应以实验证明，改变电泳时间，堆积的宽度和外形不变。当然，除非我们用相似的样品，否则所检定的染色的堆积区带并不说明所研究的蛋白质是否堆积。假定样品中存在着可染色数量的蛋白质，人们只能从不存在未堆积的染色的蛋白质区带来推测所研究的蛋白质已经堆积，因为这种未堆积的染色的蛋白质区带以扩散的带的形式在堆积区带后移动。

若依靠染色方法来阐明堆积的位置，重要的是有效而迅速地固定蛋白质区带，以便保持典型的具有堆积特征的清晰的区带界面。用三氯醋酸溶液比用醋酸-甲醇水液固定蛋白质好。我们倾向于采用 Diezel 等人的染色法[20]，因为它可在 30 分钟内给出无底色的凝胶图谱(见步骤 11)。

堆积界限的选择

堆积的 pH 最合适的话，那么所研究的蛋白质的两种选择性堆积 (SSS)，[甚至堆积的分辨力 (ITP)，见第 3 章]将取决于尽可能狭窄的堆积界限；不需要的移动慢的杂质能被阻滞在堆积区带之后移动。这种技术和选择最适 pH 的技术几乎完全相同，不同之处在于各种浓缩胶是用最适 pH 的同一缓冲系统的子系统制备。因为开始时，我们就假定所研究的蛋白质泳动率最小，所以，RM(1，ZETA) 值将增至最大值，以便与蛋白质的堆积相适应。因此，根据所选系统的子系统表的第 1 行可得到增大的 RM(1，ZETA) 值（图 6)。按同一表上第 8 和 9 行的 CONSTITUENT2 和 6 的最终浓度的 4 倍 (PHASE-BETA) 制备与子系统相应的上凝胶缓冲液系统。如果有必要的话，则表中列出的子系统中间部分的数值能用图解内插法求得，即绘制 RM(1，ZETA) 对 CONSTITUENT6（第 9 行的参数 C6) 的最终浓度曲线图，以及绘制 C2（第 8 行)对 RM(1，ZETA) 的曲线图（其中 CONSTITUET2 是可变的)。下堆积界限 RM(1，ZETA) 达最大值时必然引起 pH 的微小变化，这与前节所述的使 pH 最佳化相反，然而下堆积界限最大值所致的 pH 变化很小，它对蛋白质泳动速度的影响通常可以忽略不计。制备凝胶，电泳和凝胶的分析，均按上述选择 pH 的方法进行。

对蛋白质稳定和分离最佳条件的选择

如果对所研究蛋白质的检测系根据其活性，且堆积的蛋白质活性的回收率低于理论值，那么可以通过改变浓缩胶的离子强度、电泳时的温度、凝胶氧化还原条件，用带电的还

原剂以电泳方式洗涤凝胶，或将金属离子如 Ca^{++}、Mg^{++} 或络合物、蔗糖、甘油或与蛋白质活性相适应的去污剂加入到浓缩胶内来改善最适 pH 或接近最适 pH，并使 RM (1, ZETA) 达最大值。在每种情况下，浓缩胶内引入诸因素中的某一因素，即用上述与选择最适 pH 完全相同的方法进行检测，例如切下浓缩胶测定其活性。关于这个方面，还有少数几个专门问题需要指出。

离子强度　为了改变堆积的离子强度，只要改变浓缩胶缓冲液的浓度，上、下缓冲液仍保持不变。离子强度不同的凝胶不应在同一电泳仪中电泳，因为它们之间存在着与离子强度成反比的电压梯度。即便能控制各种离子强度凝胶的总功率，即各电流强度之和乘以各电压之和，不同离子强度凝胶间的功率差别仍不了解。在各台电泳仪中比较不同离子强度的凝胶，功率能保持恒定，且其数值可测知。但至今尚缺乏控制功率小于 1W 的电源。实际上每只 0.6cm 的凝胶给予 1W 的功率显然太大。因此，在上述电泳条件下比较不同离子强度的堆积实验时，最好是控制功率或电压，使电泳开始时，离子强度最高的凝胶增至 0.25W。在恒电压下，离子强度较低的凝胶功率最小，且随电泳时间的延长而减小。因为恒压时，电流随时间而减小。因此，为与电泳仪的热交换能力相适应，电泳时每只凝胶不超过 0.25W。当然，凝胶能耐受的最大功率 0.25W 是可变的，因为它不仅与每一特定电泳仪的散热能力有关，而且也与所研究的蛋白质对热敏感性有关。所以在各种情况下，此值应作调整。

堆积的宽度与离子强度成反比。因为堆积区内蛋白质浓度是受调节的，这就是说离子强度与堆积蛋白质浓度成正比。因此离子强度是最好的调节剂，人们可以通过调节离子强度而任意改变堆积的长度和堆积区的蛋白质浓度。“Jovin 输出”典型的缓冲系统，其离子强度实际下限值为 0.0020mol/L[21]，上限值随时间而定。由于散热容量有限，所以电源的功率不能随离子强度的增大而增大。

温度　“Jovin 输出”详细说明了 0℃和 25℃时的堆积系统，所以易于在两种温度下比较堆积区内蛋白质的活性，至少已经知道只有在下缓冲液温度为 0—2℃之间电泳时，蛋白质生物活性才能保持，这时还需要将电泳仪用聚氨酯类泡沫包围起来[22]。另一方面，发现 0℃时蛋白质的溶解度比 25℃时大，但是堆积区的高浓度蛋白质在 0℃易凝固而 25℃却不易凝固，因此在数小时的时间，利用浓缩胶试验所研究的蛋白质在已知的温度-活性曲线范围内的关系，看来是合理的。

氧化还原条件　　聚丙烯酰胺凝胶具有强氧化作用的性质是由于聚合反应中的自由基催化作用，它产生了较高浓度的过氧化物，并在聚合后保留在凝胶中，它们不带电荷，不能用预电泳的办法清除，仅能用带电荷的在电泳时可移动的还原剂 ($HS\text{-}R\text{-}COO^-$ 或 $HS\text{-}R\text{-}NH_4^+$) 通过凝胶清除。典型的例子是 T 为 10% 的分析凝胶，在 pH10 时需要 5μmol 当量的巯基化合物来进行还原[23]。实验证明，凝胶可被在浓缩胶之上的和样品之下的电泳中可移动的带电荷的还原剂还原。为了维持相的界面，还原剂层应含有 30—40%的蔗糖。在上蛋白质样品之前用带电荷的还原剂扫过凝胶，使凝胶完全处于还原状态。对每根直径为 0.6cm 的浓缩胶建议用还原剂的量为 5—20μmol。在带负电的缓冲系统中(阴离子蛋白质)常用巯基乙酸为还原剂，它能调节含共同成分 (C6) 的工作浓缩胶的 pH(PHASE ZETA)。因为它属于一种强酸，如不精确调节 pH，就应该用固体的或未稀释的 CONSTITUENT6 中和。

金属离子和螯合剂　　如要保持蛋白质的活性，可在上、下缓冲液槽内加入离子添加剂，如金属离子或螯合剂，使添加剂达稳态浓度，添加剂取决于移动的极性。通常能耐受而不影响堆积的浓度为 0.01mol/L，并应尝试几种浓度。

蔗糖、甘油、乙二醇　　一般说来，蛋白质在电泳特别是堆积时(因为堆积时蛋白质达高浓度)能产生沉淀和变性，有时可在聚合混合物中加入蔗糖、甘油或乙二醇，以改善溶剂的性质。从堆积区能有效地回收蛋白质的活性，常用 20—60%的溶液进行试验。一般，不含这类添加剂的上、下缓冲液能达此目的，尽管电泳时凝胶中添加剂渐渐减少。由于凝胶的粘度随非离子添加剂的加入而加大，通过凝胶的电压也增加，因此，为防止因电流过大而产生过多的热量，应减小电流。

去污剂　　水不溶性的疏水性蛋白质可在去污剂存在下进行电泳。在非离子型去污剂、带电荷的胆酸型去污剂或“不带电荷的”两性去污剂（如“Zwittergent 3-14”，Calbiochem）存在下能保持蛋白质的活性。最适宜的去污剂是两性离子基团与胆酸型刚性碳氢骨架相连接的分子[24]。因为即使是这类“温和的”去污剂在很高浓度时也能使蛋白质变性，通常由实验测出能耐受的去污剂最大浓度。分析不同去污剂浓度下凝胶堆积情况容易求出。带电的去污剂须加到阳极槽中或阴极槽中，这取决于去污剂极性，同时还须加到凝胶中。蛋白质有时也能溶解在低浓度的去污剂中，因此，当蛋白质与去污剂混合后，所获得的活性回收率较高。亦已报道，去氧胆酸盐和 Lubrol 对腺苷酸环化酶的分析是有利的[25]。

最适孔径：Ferguson 曲线图

定量 PAGE 有两个目的：确定适宜的分级分离方法（“最适孔径”，T_{opt}）以提供最佳的分离和物理特性。这两种目的均由实验绘制的 Ferguson 曲线图（以 $\log_{10}R_f$ 对 T% 作图）来达到，即以几种凝胶浓度进行 PAGE，并测定每一凝胶上蛋白质的 R_f 值。理想的 R_f 值范围在 0.25—0.85 之间，此范围外的 R_f 值是不精确的，它将极大地降低从统计学上评价 Ferguson 曲线图的加权函数的意义[26,27]。一个研究人员只需一天即可完成这种实验。

步骤 7：分离胶缓冲系统、分离胶和聚合催化剂浓度的选择

分离胶中 R_f 值范围在 0.25—0.85 之间的未堆积蛋白质可分别或联合应用两种方法来测定。首先通过升高（阴极系统）或降低（阳极系统）pH 将可能增大分离相（PHASE PI），在“Jovin 输出”中标明为 RM(1,PI) 或 RM(1,9) 的下堆积界限。其次，加大凝胶浓度，使凝胶提供的泳动率在理想的范围内。凝胶浓度的增大以及从“非排阻性”的高交联度的凝胶到%T 增高的同时以 2—5% C_{Bis} 交联凝胶的这种变化，使蛋白质对成分的移动受到的额外阻滞比 RM(1,PI) 的数值小，即蛋白质不堆积。经典的圆盘电泳同时采用了这两种方法。

分离胶缓冲液（PHASE GAMMA）　　“Jovin 输出”上的物理性质表(图 4) 和配方表(图 5) 列出的分离胶缓冲液，看起来所研究的蛋白质在“非排阻凝胶”中不堆积，它未考虑到凝胶，也不能期望它在特殊应用中对合适的凝胶浓度提供数值为 0.25—0.85 之间的 R_f 值，因此，实际上任意选择合适的凝胶浓度是合理的，例如，根据“Jovin 输出”提供的缓

冲液（图5上4倍于PHASE3的浓度）制备的T为5—12%之间的任一浓度和C_{Bis}为2%的分离胶。如果电泳后R_f过大，则应从子系统表(图6第1行)中选择随RM(1,9)增大的下凝胶缓冲液。同一表上的第11和12行给出的配方，以下凝胶缓冲液的两种缓冲成分在PHASE GAMMA中最终的mol浓度表示[表中标明为c(3)和c(6)；图4的上端对特殊系统中的CONSTITUENT3和6的化学成分作了规定。如果T为5—12%的凝胶的R_f过小,可应用同法相应地选用RM(1,PI)减小的子系统。

分离胶　　一旦按上述讨论的原则初步选好分离胶缓冲液后，就必须选择确定分离胶的参数,即凝胶的浓度（%T，%C）和聚合催化剂的浓度。

选择的%T的范围应使提供的R_f值0.25—0.85之间。PAGE应在三种或四种凝胶浓度，如5、7.5和10%的分离胶中进行。按步骤11的方法测R_f值(见下文),依照步骤12的方法在半对数坐标纸上绘制出初步的Ferguson曲线图。从图中可读出R_f值为0.25—0.85之间的%T。在此数值的范围内以相等的间隔选择其余的凝胶浓度。总之，为了极其精确地绘制Ferguson曲线图,应该选择七种(但至少是三种)凝胶浓度进行试验。

%C和交联剂的选择取决于研究的目的和所研究的蛋白质的分子大小。如人们的目的仅在于分析性研究，那么在各种凝胶浓度中C_{Bis}为5%交联的凝胶具有最大的排阻性。但它有缺点，甚至T为10%的凝胶也是不透明的[9]，由于这种凝胶相当僵硬，器壁粘着力也因而减小。因此，如欲进行制备性PAGE，它要求大块的凝胶具有最大的器壁粘着力,所以为了维持分析和制备条件的一致性，最好选用分析水平的2%C_{Bis}的凝胶。选择%C的另一着眼点是%C和Ferguson曲线图的斜率互相有关。Ferguson曲线图越平坦，则能用于制作分子量标准曲线的凝胶浓度范围就越宽[11]。如果人们的目的主要是测定分子量,那么C为2%是合适的。最后，如果分析分子量大的蛋白质或分子量大的蛋白质与非离子型去污剂形成的复合物[22,28]，则宜用C_{DATD}为15%的凝胶，因为它能制备成孔洞相对开放的凝胶，并保持凝胶的机械稳定性和良好的器壁粘着力。不管按什么标准来选择%C，要得到线性的Ferguson曲线图,十分重要的是各种浓度的凝胶的%C应保持恒定值。

催化剂的选择　　要选择在10分钟内聚合的催化剂,必须对每一种凝胶浓度进行试验。大体上是固定过硫酸钾和核黄素的浓度，在向聚合物中加入TEMED后聚合作用在十分钟内发生[2]。在0℃时聚合的最终浓度是：0.015%过硫酸钾，5×10^{-4}%核黄素(见图8)。在保持这二种催化剂浓度不变的同时，向凝胶混合液中加入TEMED，用量是每毫升凝胶加0.1—2μl TEMED。凝胶进行10分钟的光聚合作用(所用方法见步骤3)。严格检查凝胶表面是否平直(如表面凸起,表示催化剂量过多;如表面凹陷,则说明催化剂量太少。若以平均链长为标准,则情况相反)。将凝胶倒置,如已聚合,则从凝胶管中取出并测其机械稳定性。必要时加大过硫酸钾(碱性系统中)或核黄素(酸性系统中)的浓度，使凝胶在10分钟内聚合。通常,催化剂的浓度随凝胶浓度的增大而减小。

步骤8：分离胶的聚合

制好凝胶管后插入电泳仪中,按步骤3所述方法聚合凝胶,不同之处只是用双丙烯酰胺作交联剂,聚合物中加入的TEMED的量与%T成反比,这是因为不同量的TEMED占据了一定的空间(见图8)。通常,须细心地操作移液管,检查贮备液的pH和电导（图8),

和对聚合混合物保持恒定的脱气条件(如 0℃ 1333Pa 或 25℃ 2666Pa 5 分钟)来精确地控制 PAGE 的凝胶浓度[2]。图 9 为适用的脱气装置[18]。对于直径为 0.6cm 的凝胶，其分离胶体积常为 1.2ml。

步骤 9：浓缩胶的聚合

从下缓冲液贮液槽(图 1，A)取出上缓冲液贮液槽(图 1，c)，并倒转，振摇缓冲液贮液槽，使分离胶上覆盖的水吸到滤纸上。或者是用外科棉扦吸去覆盖的水层。轻轻地除掉凝胶管底的蜡膜。按步骤 3 详述的方法使浓缩胶聚合在分离胶上，浓缩胶体积应为样品体积的 2 倍以上。直径为 0.6cm 的凝胶其浓缩胶常为 0.5ml，如果样品体积很大，例如对于这种规格的凝胶有 1—3ml，则必须将凝胶管延长，以适应样品外加两倍体积的浓缩胶的需要。由于以双丙烯酰胺交联的浓缩胶的机械稳定性不良，应该用滤纸或棉扦吸去覆盖的水。

步骤 10：加样、电泳及从管中取出凝胶

按前述方法 (步骤 4) 制备样品。每根直径为 0.6cm 的凝胶在 0—4℃进行 PAGE 时，电流控制在 1—2mA，而在 25℃电泳则控制在 2—4mA 范围。当分离胶中标志泳动界面的示踪染料移动至距凝胶底部 2—3mm 时停止电泳，从上缓冲液贮液槽中按步骤 6 的方法逐一地取出各凝胶管。根据凝胶浓度的不同，采用下列三种方法中的一种从凝胶管中取出凝胶。

(i) 对于以 2—5% 双丙烯酰胺交联的 T 为 5—12% 的牢固的凝胶，用一支带有 23 号 6cm 长钝针头的皮下注射器，通过橡胶管与水龙头相连接，以持续不断的水流向凝胶管四周注水润湿凝胶，如果从两端润湿后凝胶仍不能从管中滑出，则可以向管内吹气挤出凝胶。

(ii) 欲取出高浓度的凝胶即 T 为 12—40% 的凝胶，用重槌将管子击破后，在水中将凝胶剥离出来。将凝胶管置于硬的表面上，用一重槌从凝胶管的一端开始轻击凝胶管不会损坏凝胶。此一方法也适用于不同% T 的很长的凝胶。

(iii) 最后一种方法，对于 3.5—5% 同一类型的凝胶，或含 10—30% C_{BIS} 的凝胶，按前述方法用一注射针头向凝胶滴加水，弃去浓缩胶，如果人们想要试图检查因蛋白质分子凝聚而不能进浓缩胶或观察未堆积的移动成分则保留浓缩胶。

步骤 11：凝胶的染色、切片和 R_f 的计算

将一根蘸有印度墨水的注射针头插入凝胶底部作标记。依同样的方法可标明堆积的位置。另一种方法测量与凝胶的长度有关，从管内取出凝胶前，直接测量凝胶管，或者根据凝胶的偏振片照片 (polaroid photography) 或者是利用测量 R_f 的电子装置来测定 R_f 值[29]。

用 (i) 对蛋白质染色，(ii) 凝胶切片并测定，(iii) 凝胶纵切后或全凝胶进行放射自显影，可获得凝胶图谱。R_f 值的测定将在第 iv 节介绍。

(i) 染色　对蛋白质的染色方法应该迅速提供无染色本底的图谱，利用一种有效的固定剂，如三氯乙酸，以沉淀全部的蛋白质，并防止蛋白质渐渐溶解。根据这些标准选择

的较好方法是 Diezel 等人提出的染色法[20]。此实验室特别描述了酸溶性蛋白质的染色方法[30]。另一种方法是蛋白质在 12.5%TCA 中变性 5 分钟，用过量的固定液（1.2ml 凝胶用 40ml）使蛋白质变性，便可忽视凝胶对固定液的稀释作用。Diezel 方法是在固定液中加入 2ml 0.25%考马斯亮蓝 G250 的水溶液，30 分钟后将凝胶转移到体积为 9ml 的带螺帽的试管中，管中充满 5%醋酸，图谱立即显现，清晰无底色，至少在数个月内是稳定的。应该注意，即使用醋酸溶液稀释后，TCA 的最终浓度仍为 2%左右。但残留的 TCA 对继续固定是不适宜的。另一染色方法是，在开始时短时间固定后，放在考马斯亮蓝 R-250 饱和的 12.5%TCA 中 30 分钟，使蛋白质染色，再转移至试管中，并贮存在 10%TCA 内[30]。此法除了不使用较差的固定液如醋酸外，还有一优点，即残留在 10%TCA 中的染料或加到 10% TCA 中的少量染料逐渐地吸附在染色的蛋白质区带上，置暗处贮存时使区带变黑。但此法有两个缺点，第一，染色液需新鲜配制，并需防止染料沉淀。方法是将 1ml 0.1%染料水溶液与 50ml 25% TCA 混合，再加 49ml 水，立即混匀，这种染液在一天内是稳定的。第二，凝胶在 10%TCA 中存放两周后发生皱缩。

SDS-PAGE 或含有其它去污剂的 PAGE 染色产生了特殊的问题。这些去污剂能与酸性固定液和染料竞争，例如带电荷的去污剂，如 SDS，竞争蛋白质与阴离子染料的反应，也妨碍阳离子染料的使用，所以必须分散去污剂的胶粒结构，以便使去污剂单体能从凝胶中扩散出来而有效地固定蛋白质。本法试图用酸性醇液使 SDS 胶粒解离来达此目的[11]。一般说来，这些方法不能可靠有效地固定蛋白质。此外，在酸性醇液中染色的本底较深，需长时间才能将染料洗脱[11]。利用在 12.5%TCA 和 50%甲醇（B. An der Lan，在制备中）中的活性碳吸附 SDS 和染料（即用扩散脱色仪，Hoefer Scientific Instruments），显然明显地加快了单体 SDS 从凝胶中扩散的速度和凝胶脱色的速度（B. An der Lan，待发表）。

(ii) 凝胶横切片和测定　使用仪器和技术可将凝胶横向切成 1mm 薄片，切片的厚薄随凝胶类型而定，适用于特定实验的凝胶浓度范围。选择切片器的标准是它应能切各种直径的凝胶。无论用凝胶浸渍法或用保留未切片的残留端切除移动界面前沿部分的切片技术均用得不多了，因这样处理难以用 R_f 表示区带的特征。至今尚缺少一种能根据不同%T 和%C 而改变切片的厚薄并适应不同大小凝胶和测定 R_f 值的商品切片器。本实验室已报道了一种隔膜式切片器，它符合上述标准，可由现有的商品配件组装而成[31]（图 10）。一种市售的带有电振动器的金属丝切片器（hoefer scientific）适用于大分子蛋白质所用的 15% DATD 交联的弹性较大的凝胶，至少是用于 T 大于 5%的凝胶。但是目前这类切片器的振动频率偏高，需要通过变阻器根据%T 和凝胶直径成比例地减慢。

通过对凝胶切片的同位素测定或凝胶切片提取物中蛋白质活性的分析得到蛋白质图谱。在前一情况下，如欲对 β-蜕变的放射性同位素进行测定，则需将切片溶解[3]，而对 γ 蜕变的同位素即可直接用凝胶切片进行测定。溶解凝胶的条件取决于%T 和选用的交联剂(参考文献 [3]; 也参见第 1 章)。

凝胶切片活性的测定通常是将凝胶切片培育在测定液中。蛋白质从凝胶中扩散出来的速度随蛋白质的构象、聚丙烯酰胺对蛋白质吸附的程度以及凝胶浓度的变化而变化，如欲获得具有最高活性的洗脱液，应该绘制扩散时间对活性的时间曲线。

(iii) 放射自显影　通常是将柱凝胶作纵向切片或将 1—2mm 厚的板凝胶在滤纸上

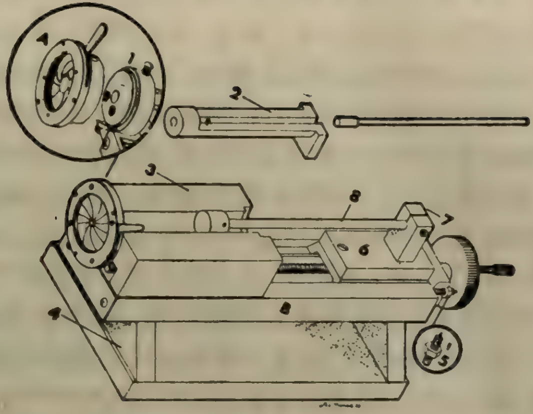


图 10　凝胶切片器示意图。适用于直径为 0.3、0.6 和 1.8cm 的柱凝胶。除 3、6、7、8 部件外，其它部件有商品出售。设计见参考文献[31]。

干燥后进行放射自显影，以检定放射性蛋白质(第 1 章)。因为高浓度的聚丙烯酰胺凝胶干燥时易龟裂，所以在干燥前先将凝胶用 5% 聚乙二醇(分子量为 20,000) 和 5% 甘油的溶液平衡半小时。本实验室已制成 0.6cm 凝胶的纵向切片器[2,32]，其结构见图 11 (结构详图供索取)。已有商品成品 (Miles, Elkhard, Ind)，但它仅适用于直径 0.5cm 的凝胶，还缺少旋紧的螺旋及在台面上切片所需要的稳重的底座。切片干燥机商品(Hoefer Instruments) 是令人满意的。以 γ 蜕变标记的蛋白质可直接将凝胶管置于胶片上曝光作放射自显影 (Kodak X-Omat R, XRI)，如有必要，可利用增感屏(dupont lightning plus)。凝胶放置在装于适宜的上缓冲液贮液槽内的截面为长方形(内径 2×4mm) 的管子中，最适合做放射自显影 (B. An der Lan 等，待发表)。若凝胶上每条蛋白质区带计数为 5×10^5cpm 即可直接在商品纸带扫描器上扫描[33]。

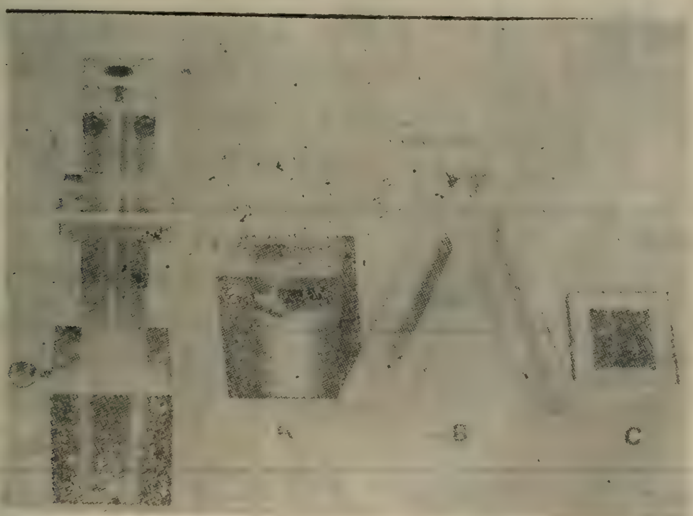


图 11　用于直径 1.8cm 的凝胶的带导向板的纵向切片器，由 A，铝金属座；B，有机玻璃的凝胶支持架；C，带不对称固定的凝胶切割丝的金属丝架。

(iv) R_f 的测定　测定蛋白质在分离胶中与蛋白质区带前的泳动界面有关的移动距离，是蛋白质区带图谱的特征（相对泳动率，R_f）。在许多情况下，以在特定的堆积界限之间 [RM(1,PI) 和 RM(2, LAMBDA)] 移动的染料（“示踪染料”）来标明泳动界面的前沿，而在另一些情况下，采用化学检测法来检定后续成分 (Cl) 或是先导成分 (C2) 以确定泳动界面，例如，凝胶中硫酸盐与 0.1mol/L 氯化钡培育，氯化物则与硝酸银培育（见步骤 6）。或者用同位素分析法测定标记 CONSTITUENT 1 或 2 。现有一种测定 R_f 的电子装置[29] 用来测定染色凝胶图谱的 R_f，并有商品供应 (Hoefer Scientific)。如果制备的凝胶具有重复性，又在严格控制条件下电泳，那么 R_f 值也具有高度重复性[26]。测定每一种凝胶浓度下所研究的蛋白质和分子量标准蛋白质区带的 R_f 值，是“定量 PAGE” 所要求的唯一的实验工作，它提供了 “R_f-%T” 数据组，以便计算 Feguson 曲线图和用一组命名为“PAGE-PACK” 的计算机程序，以全自动化的形式计算出其它参数[2,7,26,27,34]。

PAGE PACK

	数据文件	程序	输入	输出
1.	PAGEPACK		指令	
2.	PAGE程序		FORTRAN程序	
3.	01数据卡		R_f, %T	
4.		RFT1		K_R, Y_o
5.	02数据卡		Prot.#, K_R	
6.		PLOTRUN		$\bar{R}$, MW
7.	03数据卡		Prot.#, K_R R_f K_{AV}	
8.		GIANTRUN		$\bar{R}$, MW $\frac{MW}{\bar{R}}$
9.	04数据卡		K_R, Y_o, $\bar{R}$	
10.		CHARGE		N_o, V
11.	06数据卡		$[K_R, Y_o, \bar{R}]A$ $[K_R, Y_o, \bar{R}]B$	
12.		TOPT		$T_{\text{最适}}$, $T_{\text{最大}}$
13.	"MUNI"	IDENT	7个参数	T测验差别显著

图 12　PAGE-PACK 计算机文件和程序一览表。

步骤 12：Ferguson 曲线图的计算

在半对数坐标纸上绘制 R_f-%T 一组测定值的 Ferguson 曲线图（即 $\log_{10}R_f$ 对%T）。如果起始在大的范围内使用前文建议的最少数量的凝胶浓度，此曲线图将标明欲使 R_f 值在 0.25—0.85 的理想范围内所需要的该凝胶的浓度。为了获得曲线最适的统计学意义，希望在此范围内有 7 组 R_f-%T 数据，最少需要三个组数。因此实际上这一步是重复步骤 8—11，以累计 Ferguson 曲线图所需的点数，手工作图允许我们将点定在实验证实确实需要的地方。

PAGE-PACK 是用于制作和评价 Ferguson 曲线图的计算机程序[2,7,26,27,34]，它提供足够的统计学上无误差的数学操作并较快地给出 R_f-%T 组的数据。美国生物医学计算技术情报中心、Room1302、Vanderbilt 医学中心、Nashville、Tennesee37232 将 PAGE-PACK 制成磁带、表格及指令的形式，程序统一编号为 MED-34-PAGE-PACK。程序以 Fortran IVG 的形式编写。图 12 列出了 PAGE-PACK 的内容及它们以 NIH 形式的编排。相应于这些内容的程序名称在指令中给出。图 13—23 列出了典型的 PAGE-PACK 关键程序的输入和输出的格式。

将各种%T 的 R_f 值输进到输入文件中（图 13），最好使用远程终端机。输入 RFTI 程序以便计算 Ferguson 曲线图的斜率，K_R、排阻系数（测定分子大小）、Ferguson 曲线图的 y 截距，y_0（测定分子净电荷），它们的标准差和（$\log R_f$）/%T 的相关系数。图 14 中这些参数以箭头或括号指明。并以数字形式计算出 K_R 和 y_0 的 95% 可信限的连合包络线，在以 y_0 为对数坐标的半对数坐标纸上，用手工绘制出包络线（图 15）。最后，RFTI 程序提供了具 95% 可信限的包络线和 Ferguson 图共同组成的图象，以利于对曲线（图中十字影线）及综合观察时（图中影线）进行观察（图 16）。

```
18.   ←系统
2.    ←C%                : RFT1程序
800.  ←蛋白质编号
9.    ←实例编号
3.5     .959
3.75    .935
4.5     .730
5.      .640
6.      .533
7.      .470
8.      .390
9.      .320                输入
10.     .240
18.                    DATA10文件
2.
801.
9.
3.5     .898
3.75    .840
4.5     .625
5.      .575
6.      .465
7.      .390
8.      .300
9.      .230
10.     .140
9999.
```

图 13　DATA01 号文件输入格式。

同一性试验

若在各种凝胶浓度，最适 pH、离子强度、温度以及提供最大稳定性和活性的其它条件的缓冲系统中制作 Ferguson 曲线图时均出现单一成分，表明分子是均一的。若应用其它的物理方法来检查均一性所根据的分子性质与 PAGE 分离所根据的分子性质相同，显然不应利用这一方法，尤其是这种“独立的方法”在以理论塔板数 N 表示的数值比 PAGE 低时更是如此。

不同时间或不同实验室进行的各次实验之间经常会提出分子同一性的问题。这一问题只有在分析工作是在完全相同的 PAGE 条件下进行才能解决，也可根据研究的每一成分的浓度分布图象的形态（峰形），或是根据 R_f 值或 Ferguson 曲线图来解决同一性问

星期二　　1980 年 4 月 22 日

系统　18.2.0.　交联度　2.00　蛋白质　800.00　作业　　权数

T	RF	预定的 RF	log(RF)	log(RF)	
3.50	0.9590	0.93358	−0.01818	−0.01802	0.24112
3.75	0.9350	0.88710	−0.02919	−0.02858	0.23415
4.50	0.7300	0.76118	−0.13668	−0.13630	0.21158
5.00	0.6400	0.68720	−0.19382	−0.19275	0.19541
6.00	0.5330	0.56024	−0.27327	−0.27274	0.16165
7.00	0.4700	0.45673	−0.32790	−0.32772	0.12831
8.00	0.3900	0.37235	−0.40894	−0.40846	0.09792
9.00	0.3200	0.30356	−0.49485	−0.49424	0.07219
10.00	0.2400	0.24748	−0.61979	−0.61959	0.05174

未加权回归方程

X 平均数=6.31　*Y* 平均数=−0.2781　反对数 (*Y* 平均数)=0.527147

Y 截距 *A* = 0.27499E + 00　标准差 *A* = 0.022982

反对数 *A* = 1.88359　反对数 (*A* + 1 个标准差)=1.98595

斜率 *B* = −0.87709E − 01　标准差 B = 0.34406E − 02

相关 *R* = 0.994658

变异 *Y* = 0.42497E − 01

Y 残差=0.51756E − 03

平方残余和=0.36229E − 02

$X_{测得值}$总和=56.75

log*Y* 总和=−2.5026　$X_{测得值}$的平方和=401.562

$X_{测得值}$×log*Y* 之积的总和=−19.61520　log*Y* 的平方和=1.0359

加权回归方程

最大可能的方法　10 次重复

| Y_0 = 1.908236 |　| K_R = 0.08871 |

X 平均数=5.35818　*Y* 平均数=−0.194691　RF 平均数=0.63872

Y 截距 *C* = 0.28063E + 00　标准差 *C* = 0.23708E − 01

反对数 *C* = 1.908236

Y_0 + 1 个标准差=2.01530　标准差 Y_0 = 0.10706 ←

斜率 *D* = −0.08871　标准差 *D* = 0.41816E − 02 ←

→相关 *R* = 0.998905

变异 *Y* = 0.47821E − 02

Y 残差=0.83704E − 04

测定标准差=0.91490E − 02

平方残余和=0.58593E − 03

W 乘以 $X_{测得值}$之积的总和=7.46965　*W* 乘以 $X_{测得值}$之积平方和=44.81082

W 乘以 log*Y* 之积的总和 =−0.27141E + 00　*W* 乘以 log*Y* 之积平方和=0.91098E − 01

权的总和=1.39406

W 乘以 $X_{测得值}$再乘以 log*Y* 之积的总和=−1.87893

总和 (WXX) = 4.78703　总和 (WYY) = 0.38257E − 01　总和 (*WXY*) = −0.42466E + 00

平方残余和除以权数总和=0.42030E-03

图 14　RFTI 程序的输出格式，五个主要的输出参数列在方格内或以箭头标出。

题[26,35]。后一种方法是最适的解决方法，即在同一图上（半对数坐标纸上，y_0 取对数坐标）画出两条有关的 Ferguson 曲线图的 K_R 和 y_0 具有 95% 可信限的连合包络线（图 15），即可解决同一性问题。二种成分的包络线重叠，表明它们在特定的条件下是不能分辨的。不重叠则表示可以区别，部分重叠则需分析。如果包络线大小差别很大，通过增加较大包络线数据点（R_f-%T 组）的数目使其减小到较小包络线的大小。如果呈椭圆形重叠，而且

在相同的条件下最好是同时进行成分分析，那么最好使用更精确的统计学方法来解决，并利用 IDENT 程序来减小 K_R-Y_0 包络线[26]（图 12)。本文未提供运用这一程序的指令，以免因此次要的方面而使 PAGE-PACK 的主要问题复杂化，但是已编制出了 BASIC 程序和指令以供索取应用。

```
                                                        输出 2
  星期二            1980.4 .22
系统18.2.0              交联度2.00                  蛋白质800.00
 y0和KR共同的95%可信限
F =   4.74

   0.28063E+00  -0.08871    5.35818  -0.19469
   9    1.39406     0.83704E-04    4.78703
斜率                  下y0                     上y0
  -0.10158          2.23668                2.23668
  -0.09515          1.96997                2.16659
  -0.08871          1.80625                2.01597
  -0.08227          1.68069                1.84843
  -0.07584          1.62802                1.62802
```

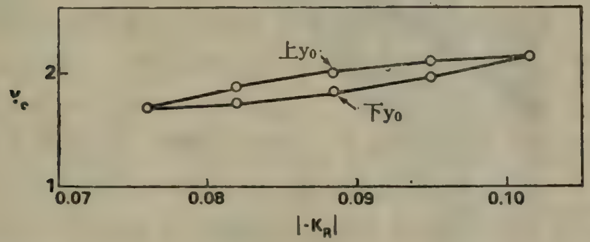


图 15　RFTI 程序输出格式（续)。用数字（图上部）表示的 K_R 和 y_0 的 95%可信限连合包络线及在半对数坐标纸上需要用手工作出的图（图下部)。

分子大小和电荷异构

考查 PAGE 在同一凝胶内或不同凝胶之间的区带不能提供关于每条区带中各蛋白质之间物理关系的任何资料，相反，Ferguson 曲线图分析，特别是据此衍生得到的 K_R 对 y_0 的曲线图确实提供了这种信息（图 15)。例如，平行的 Ferguson 曲线图阐明了分子大小相同而净电荷不同（电荷异构)；Ferguson 曲线图在 y_0 轴或近 y_0 轴的交叉则认为是一类低聚物（亦即表面净电荷密度相同)，但分子大小有所不同（分子大小异构)（参见第 1 章及参考文献 [36])。 交叉的 Ferguson 曲线图则表明各物质之间在电荷和大小上均不相同（见第 1 章；参考文献 [7] 的图 19)。K_R 与 y_0 的曲线图也提供相似的信息，但对这些参数增加了统计学的意义。例如，沿着 K_R 轴的 K_R 和 y_0 的 95% 可信限的连合包络线彼此之间互相重叠，则证明为分子大小异构，而沿着 y_0 轴的包络线彼此之间可互换则表明为电荷异构。一般说来，同一蛋白质有几种寡聚体和电荷异构体，所以，从图中数种能相互代替的由水平和垂直方向组成的包络线图象表明分子是均一的。如果仅计算凝胶上蛋白质区带的条数，仍不能了解分子是否均一。甚至一系列 Ferguson 曲线图，图形上重叠，但每一图形无统计学范围内的重叠性，那也不能明确提出分子是相同还是不同的证据，以及是电荷异构或分子大小异构关系的证据。但后一关系可根据“椭圆形”的图形来直接加以证明。因此，这是应用 PAGE-PACK 计算而不用未经计算分析的 Ferguson 曲线图的主要理由之一。

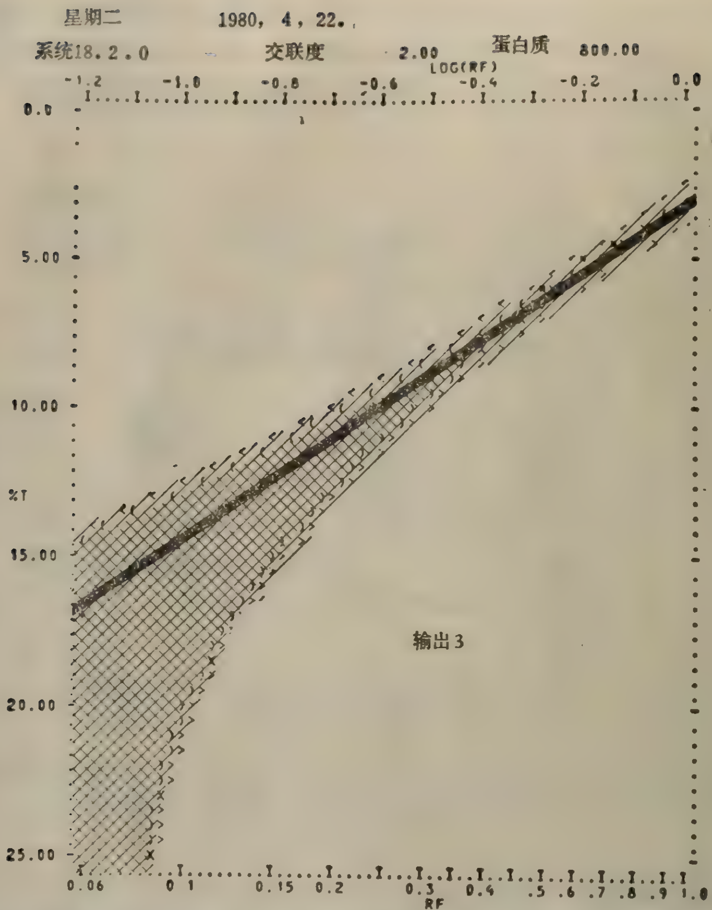


图 16　RFTI 程序输出格式(续)。$\log R_f$ 与%T 曲线图（Ferguson 曲线图）。十字影线表示与直线相交的 95%可信限包络线，影线为整体观察时相应的包络线。

物理特性

在 95%可信限范围内的 K_R 和 y_0 值，是来自实验测定分子大小和净电荷的一种方法，这就是说它们不是来自任何设想。因此，以蛋白质的 K_R 和 y_0 的 95%可信限连合包络线来描述蛋白质，因为它直接估算出蛋白质分子在特定的缓冲介质中的分子大小和电荷状态。人们能选择疏水性程度不同的缓冲介质，发现大分子的主要性质(即电荷、大小和疏水性)都表现在 PAGE 包络线内。这一事实说明除了 PAGE 以外采用其它对上述性质灵敏的方法来检查分子的性质或探查各部分的分子性质就显得繁琐多余。其它一些对分子大小或电荷敏感的分级分离方法，如凝胶过滤、DEAE-或 CMC-层析，实际上不如 PAGE 有效，因为它们的理论塔板数较低[1,37]。应该指出，与 PAGE 相同的其它利用分子大小不同进行分级分离的冗长的方法，只适用于含数种成分系统的分析，而不适用于多种成分系统的分析。测定 T_{opt}（见下文），并用 T_{opt} 对蛋白质进行分级分离时仅适用于含少数成分的简单混合物。这是因为在多成分系统条件下，由于人们不能确定在一种 %T 时的蛋白质区带 (R_f) 是否相应于另一%T 时的同一蛋白质，因而不能绘制出 Ferguson 曲

线图。因此，在能测定任何两种成分分离胶的最适浓度之前需要先对多成分系统进行预分离。

至于作为测定分子大小的 K_R 的物理意义和测定分子净电荷的 y_0 值的物理意义还不清楚。从孔径理论考虑，以 K_R 表示分子大小的特征取决于凝胶类型，例如，在理想的情况下，K_R 值可从实验上由末端可忽略的长纤维组成的凝胶中求出，它反映了分子表面的面积。而与此相应的是，在"点凝胶"中，这类凝胶纤维的长度短到可以忽略不计，推测的 K_R 值将反映分子的体积[7,37]。这些推测显然似是而非，仍急待进行试验证实。目前这种推测仅作为一种准则用来解释 K_R 对分子大小的量度。同时假定常用的以 2—5% 双丙烯酰胺交联 PAGE 是一种"无限长的和一维的"型式，而以 5—10% 双丙烯酰胺交联的凝胶，或以 DATD 高度交联的凝胶近似于"无长度或零维的"型式[1,7,37]。在真正的凝胶中人们期望的凝胶是一种介于"一维的"和"零维的"中间类型，它取决于%C 和聚合的速度（催化剂浓度、温度），而聚合速度与平均链长成反比。

解释作为分子净电荷一种量度的 y_0 的意义甚至比解释 K_R（见上述有关讨论，参考文献 [26，27，38]）的意义更困难。问题是 y_0 值与 K_R 相似，也随%C 的变化而变化，除非%C 为高浓度（10—50%）它才保持不变[9]。因为分子的化合价不随%C 的变化而变化，所以尚难确定某种 y_0 值可用来计算化合价。其次，在 T 为 0—2% 的范围内作出的 Ferguson 曲线图可能是非线性的，由于不能制备这一浓度的凝胶，因而既不能证实也不能否定这一见解。最后一个问题是计算化合价本身要作大量的假设，下文将进一步说明。尽管将 y_0 变换为化合价有某些缺点，但解释和评价各类物质之间以净电荷表示的性质上的差别常常是有益的。

与直接解释作为测定蛋白质分子大小和净电荷多少的实验参数 K_R 和 y_0 相反，将 K_R 转换为习惯用的分子大小的参数（分子半径和分子量），以及将 y_0 转换为自由电泳的泳动率和分子化合价，依赖于许多设想，因此十分重要的是区别以 K_R 和 y_0 表示的分子特征，它描述的更精确，但难于概念化，而以转变的参数描述的分子特征虽然不够精确，但以大家熟悉的形式表达出来。例如，由 PAGE 测得的以分子量为 60,000 来描述一个分子，这给人们一个形象，而相应的 K_R0.04（它更精确）来表示，却不能给人们这种印象，除非 K_R 得到普遍应用时才行。因此有理由认为目前"转变"参数仍然有价值，借助于 PAGE-PACK 按以下步骤进行转换：

步骤 13：分子量标准品的 Ferguson 曲线图

相当均一的蛋白质标准品必须表现为一条主要的区带。目前虽然有用于 SDS-PAGE 的分子量标准品的商品，但缺乏用于 PAGE 的天然蛋白质商品。所选择的标准蛋白质其分子量范围应包含未知物的分子量在内，并尽可能在化学组成上类似于未知蛋白质，如糖蛋白、脂蛋白及核蛋白不能混合，球形蛋白不能与完全不对称的蛋白质相混合。假设能这样选择标准品，那么七种标准分子量的蛋白质即足以满足需要。事实上，人们很少能如此选择，因为能利用的蛋白质在这些方面都有变化，若欲使组分和构象上的差别随机分配，通常必须使用 10—20 种标准品。因此，所选择的蛋白质范围必须很窄：它们能在适合于未知蛋白质的缓冲液中的堆积，尽管人们可以在堆积标准蛋白质的子系统中选择性地调整浓缩胶的堆积界限（图 6）和在同一分离胶中比较未知的和标准的蛋白质。绘制 10—20

种分子量相差较大的标准蛋白质的 Ferguson 曲线图，要求在孔径范围较大的凝胶中进行 PAGE，因而最好是在凝胶管中进行电泳。这就要求作大量工作。如果一个操作人员每天用两台电泳仪，每台电泳仪有 12—14 根凝胶或二个 Ferguson 曲线图，一天最多也只能处理四种蛋白质，因此，制作一条标准曲线至少需要 2—4 天的工作。若分子量范围小到足以在四种凝胶孔径下分析全部的蛋白质，此过程就可因其中一种因素而缩短。在这一情况下，每一特定%T 浓度的垂直板胶是节省人力的。否则绘制标准品 Ferguson 曲线图的方法与前述方法相同。

对于 SDS-PAGE 而言，Ferguson 曲线图上标准的和未知的蛋白质的相对自由泳动率 y_0 是相等或几近相等，尚需实验来证实。如果在 T 浓度为零或接近于零时，任何标准品或未知物的 y_0 值不同于蛋白质所共有的 y_0 值，这是由于 SDS 量不足以使蛋白质表面达到饱和程度(在 1%SDS 100℃下反应时间不够)，或者是由于与非蛋白质部分发生共价结合，因而 SDS-PAGE 中分子量的测定只能用下述与 PAGE 相同的方法来解决，并假定 SDS-多肽复合物的构象是任意卷曲的，即以分子量(MW)对 K_R 的标准曲线来测定(步骤 14)。反之，若在%T 为零或接近于零时标准品和未知物的确具有共同的 y_0，则可借助于 $\log_{10}$(MW)对 R_f 的 S 形标准曲线，或者在限定的分子量范围内(用步骤 14 中的 GIANTRUN 程序图 17 中，输入标准品和未知物的“RF”和 R_f 值)于曲线中间的线性部分，或用适当的平滑而又对称的对数曲线的非线性部分，在一种%T 浓度的凝胶中测定分子量[34]。

血球凝集素 I 和对照 pH2.9

GIANTRUN 程序

KR←—聚丙烯酰胺凝胶电泳，凝胶过滤，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

51.←—蛋白质号数	.0567←—K_R	标准蛋白质 输入文件 DATA03
6.	.04674	
45.	.08044	
114.	.09134	
11.	.1096	
60.	.1331	
800.	.08871	未知物
801.	.10887	
999		

输出 1

蛋白质名称		分子量	半径	K_R	
51.0	木瓜蛋白酶	20700	1.82430	0.05670	1
6.0	糜蛋白酶	21600	1.85040	0.04674	2
45.0	Lactoperoxase*	93000	3.01030	0.08044	3
114.0	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	140000	3.45000	0.09134	4
11.0	γ 球蛋白	160000	3.60700	0.10960	5
60.0	过氧化氢酶	232000	4.08260	0.13310	6

图 17 GIANTRUN 程序输入格式。上图：输入文件 DATA03；下图：输入参数的输出表。

* 疑为乳过氧化物酶。——译者

步骤 14：K_R 转换为分子半径($\bar{R}$)和分子量(MW)

将未知物和标准品的 K_R 值输入到数据文件中(图 17，上图)。数据文件第 3 行的

“K_R”的输入确定了数据分析的类型，即根据球蛋白 [$(K_R)^{\frac{1}{2}}$ 对 $\bar{R}$] 或随机卷曲的蛋白质 (K_R 对 MW) 的标准曲线来计算分子几何平均半径 $\bar{R}$ 和分子量 MW。然后，由程序将这些输入数据综合(图 17，下图)，根据球蛋白的标准曲线来计算未知物的 $\bar{R}$ 和 MW 和标准曲线的相关系数,同时还提供以十字影线表示的和适用于综合观察的,以影线表示出的具有95%可信限的包络线标准曲线图 (图 19)。类似的计算和曲线 (未表明) 也用于随机卷曲的蛋白质,在 K_R 转换成 $\bar{R}$ 和 MW 时假设以下三种情况:

(i) 未知蛋白质和标准蛋白质具有一般的球状或随机卷曲的构象。

(ii) 微分比容为 0.74。

(iii) 未知物和标准品无水合作用。

为了减小上述假设引起的误差，应选择与未知物构象相同的标准品进行试验。如果未知物是一种结合蛋白，也应选择结合相同部分的标准蛋白。由上述三种假设与客观实际不一致所引起的系统误差,随标准品数目的增加而减小。

对于 SDS-PAGE，在上述指定的范围内可用同一程序 (图 17—19) 将 R_f 转变为 MW。 这时用字母 RF 代替 KR 输入到输入文件中 (DATA 03，图 17)，再以 R_f 值代替 K_R 输入。

输出 2

星期二　1980 年 4 月 22 日

血球凝集素 I 和对照 pH2.9

运算数据

$X = KR^{\frac{1}{2}}$	Y = 半径	
0.23812E + 00	0.18243E + 01	1
0.21619E + 00	0.18504E + 01	2
0.28362E + 00	0.30103E + 01	3
0.30223E + 00	0.34500E + 01	4
0.33106E + 00	0.36070E + 01	5
0.36483E + 00	0.40826E + 01	6

抛物线试验中　　非线性不显著

Y 依 X 的未加权线性回归方程

$Y = -0.17941E + 01 + (0.16468E + 02) \cdot X$

X 平均数=0.28934E + 00　　Y 平均数=0.29708E + 01

Y 截距 A_1 = −0.17941E + 01　　标准差 A_1 = 0.53607E + 00

斜率 B_1 = 0.16468E + 02　　标准差 B_1 = 0.18246E + 01

→相关 R = 0.97632

Y 残差=0.51976E − 01

σ-子系统−Y = 0.22798E + 00　　总和 (XX) = 0.15612E − 01

X 依 Y 的未加权线性回归方程

$X = 0.11739E + 00 + (0.57882E - 01) \cdot Y$

X 截距 A_2 = 0.11739E + 00　　标准差 A_2 = 0.19835E − 01

斜率 B_2 = 0.57882E − 01　　标准差 B_2 = 0.64131E − 02

X 残差=0.18269E − 03

σ-子系统−X = 0.13516E − 01　　总和 (YY) = 0.44419E + 01

自由度为 4 时的 t 值=2.77

利用 y 依 X 的回归方程内插未知数

蛋白质	KR	半径	上限	下限	分子量	上限	下限	名称
800.0	0.08871	3.1108	3.7931	2.4285	102620.	186036.	48824.	
801.0	0.10887	3.6396	4.3507	2.9285	164356.	280739.	85616.	

图 18　GIANTRUN 程序的输出格式(续)。方框内或以箭头指明的为主要的输出参数。

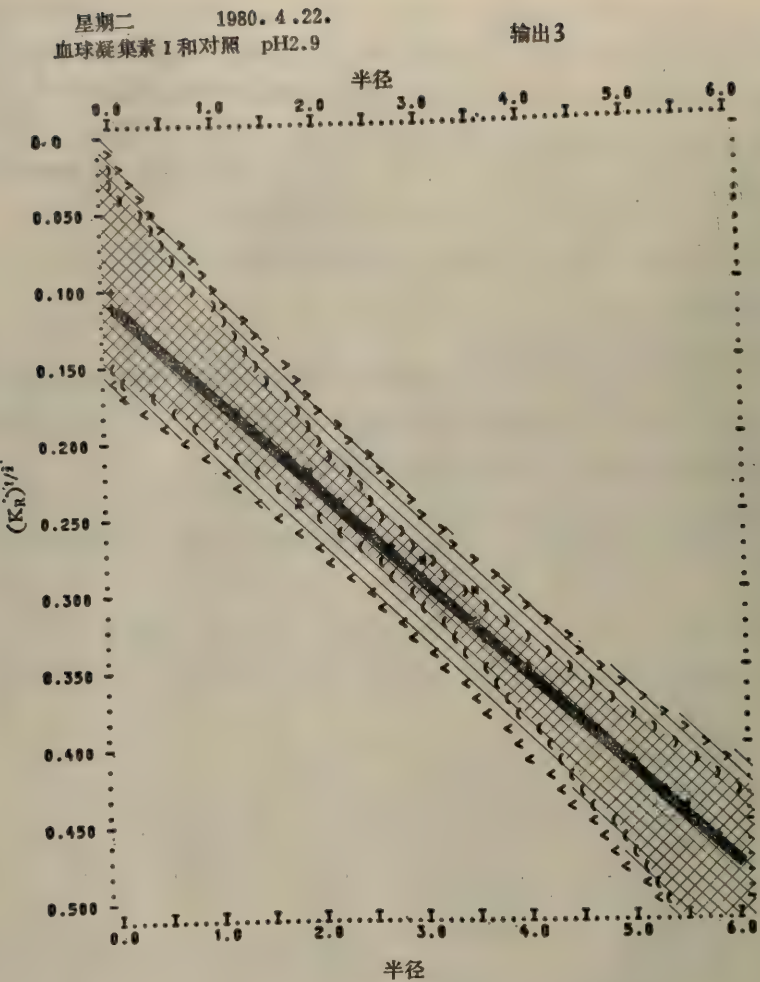


图 19 GIANTRUN 程序的输出格式（续）球蛋白的 $(K_R)^{1/2}$ 对 $\bar{R}$ (nm) 的标准曲线。半径轴上的直线的负截距系推测以量度聚丙烯酰胺纤维素的厚度[37]。线上标明的符号及可信限与图 16 相同。

步骤 15：Y_0 转换与化合价，V

Y_0 和 $\bar{R}$ 值是转换成计算自由泳动率 $M_0\left(\frac{\text{cm/sec}}{\text{V/cm}}\right)$ 和化合价 V（净质子数/每个分子）的输入参数（图 20）。涉及这一计算的假设很多：如根据 Debye-Hueckel 理论在带电大分子周围存在的电势梯度；大离子为球状的；小离子(缓冲液)为单价的；净电荷小于 10；表面电荷均一；大离子为刚性；大离子不导电；缓冲液和水的介电常数相等；牛顿粘滞度 (Newtonian viscosity)。从 Y_0 计算化合价和解释与 Y_0 有关的其它问题，已在前文讨论。

最适分离孔径

对任何一对已知 K_R、Y_0 和 $\bar{R}$ 的蛋白质来说，其凝胶孔径的最佳化是利用 PAGE 进行“定量”最为重要的操作条件。前文已介绍最适孔径的理论基础及其图解法[39]。

CHARGE 程序 DATA04 文件

星期二，1980 年 4 月 1 日

本程序由国立卫生研究所国立儿童保健和成人生育研究分所

国立卫生研究所 David Rodbard 设计，Loel Graber 行 Fortran 翻译

系统 18.00	交联度 2.0		蛋白质 801.0	Y_0 = 2.094193		
RM(1,9)	离子强度	温度	MU(Na+)	MU(前沿)		输入
0.140	0.0150	0	0.000245	0.34235E − 04		

自由泳动率= 0.7169462E − 04 ←

半径= 0.3640001E − 06

平衡离子半径= 0.2500000E − 07 输出

DEBYE-HUCKEL 厚度倒数 = 0.3978788E + 07

1.44828 的 HENRY 函数=X_1 = 0.1043548E + 01

电荷(库仑/分子)=Q = 0.1957434E − 10

化合价(净质子数/分子)=V_1 = 0.1222637E + 02 ←

I = 1 时的泳动率=.1= 0.4179173E − 0.4

3.73944 的 HENRY 函数=X_1 = 0.1116080E + 01

图 20 CHARGE 程序输入和输出格式。箭头标明主要的输出参数。

步骤 16：最适孔径的计算

将待分离的两种蛋白质的特征参数 K_R、Y_0、$\bar{R}$ 和测定时的电泳时间和温度同时输入到 T-OPT 程序中（图 21）。T-OPT 程序即可计算出两种蛋白质具有最适分辨率的凝胶浓度（图 22），并绘制分辨率对凝胶浓度的曲线图（图 23）。如果凝胶浓度为零时具有最适分辨率，则这种输出对利用等电聚焦电泳或等速电泳也给出确切的回答。在图 22 和 23 给出的实例中，确实存在一种最适条件，但预料它的分辨率比最适条件下的 10.8% T 略低。不过，在许多情况下，真正的最适条件是 %T = 0，它提供的预测分辨率比 %T 为任何浓度下的 PAGE 所能预期的分辨率高。至少我们在进行两种或数种成分的分离时，T-OPT 计算的这种结果是应用某种电荷分级分离法、等电聚焦或等速电泳不可缺少的必要条件(见第 3 章和第 4 章)。

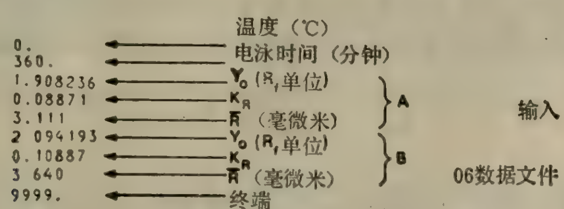


图 21 T-OPT 程序的输入格式，A、B 为待分离物质。

制备性 PAGE

任何一种制备性 PAGE，无论是用切片法和切片提取法[40] 或者是用连续区带洗脱法[41]，只能应用于简单的蛋白质混合物。复杂的混合物必须在应用制备性 PAGE 之前，用层析及其它分级分离方法将混合物分离成较为单纯的混合物。对简单和复杂的混合物分离方法上的这种差别来自前文中曾予以讨论的最适% T的性质。因此，在复杂的混合

星期二　1980 年 4 月 22 日

本程序由国立卫生研究所国立儿童保健和成人生育研究分所国立卫生研究所 David Rodbard 设计，Loel Graber 行 Fortran 翻译

输出 1

温度=0.0　　　时间=360.

A：Y_0 = 1.908236　　　K_R = 0.08871　　　半径=3.11100

B：Y_0 = 2.094193　　　K_R = 0.10887　　　半径=3.64000

V_1 = 0.0　　　V_2 = 0.0

A 和 B 的泳动率相等时的凝胶浓度　　2.003214

最佳分离时的凝胶浓度　6.414705

最适分辨时的凝胶浓度　10.826197←——

A 未堆积时的凝胶浓度　3.163477

B 未堆积时的凝胶浓度　2.948625

T = 0 时另一种 T_{MAX} 和 T_{OPT}

分子大小和电荷对分离的相反作用；我们建议改变 A 的 pH，进行等电聚焦或等速电泳，如果你用二聚体或寡聚体则除外。

凝胶浓度	分离	分辨率	A 的泳动率	B 的泳动率
0.0	− .185958	−1.096735	1.90824	2.09419
6.414705	0.095316	1.152947	0.51474	0.41942
10.826197	0.070252	1.384117	0.20905	0.13879
3.163477	0.052435	0.441305	1.00000	0.94757
2.948625	0.044863	0.368598	1.04486	1.00000
30.000000	0.003027	0.472873	0.00416	0.00113

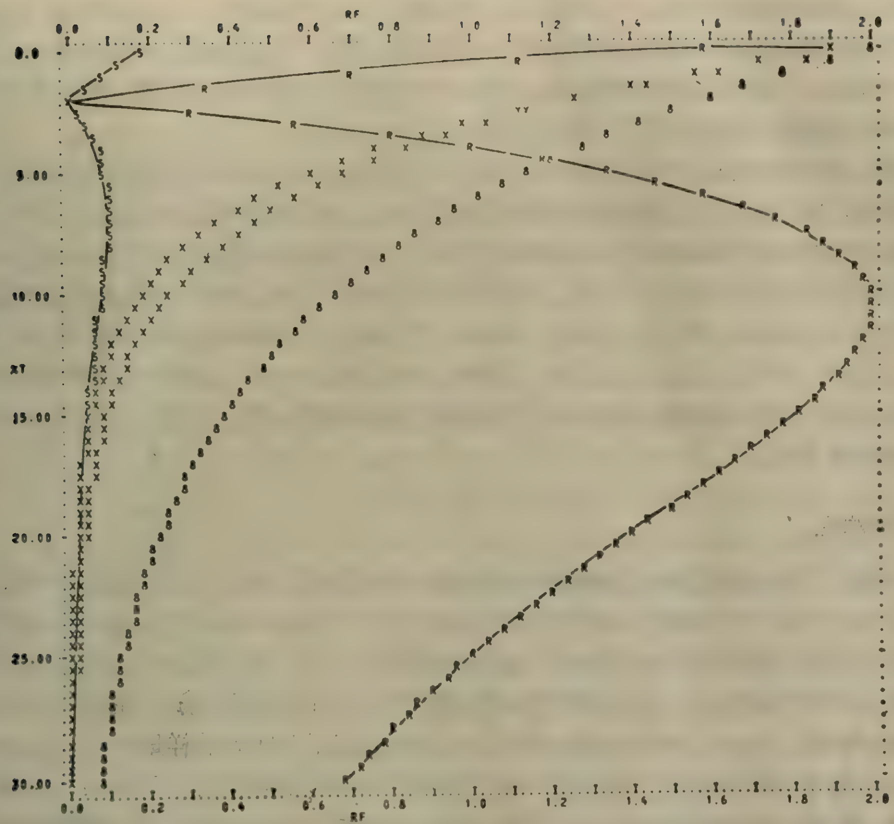
图 22　T-OPT 程序的输出格式。箭头指明成分 A 和 B 获得最适分辨率的凝胶浓度。输出数据指出在%T = 0 时分辨率最大，并建议应用等电聚焦或等速电泳。

物中，若将与待分析蛋白质区带相邻的每一种蛋白质区带的 T_{opt} 计算出来，并综合考虑二个 T_{opt} 的折衷值进行电泳，则原来在凝胶图谱中距所研究的蛋白质区带较远的区带，此时将移至其邻近处，而使所研究的蛋白质与其相邻的蛋白质不可能获得足够的分离，以便进行制备性分离。这一点对基于凝胶切片和凝胶提取的制备方法同样是确切的。正如在制备性洗脱的 PAGE 中一样，虽然在第一种情况下出现区带可能提示两种蛋白质之间可以分离，但在两蛋白质区带相邻的情况下完全可能出现区带的重叠。然而事实上，染色凝胶图谱上的区带很少是区带的最宽分布[42,43]，因为染色方法不灵敏而不能观察到。

凝胶切片的提取

若同时分离数条区带，适宜的方法是将区带切下并从凝胶切片中提取分离的蛋白质[40]。若制备的单一成分达毫克量级以上，则“洗脱-PAGE”（见下文）节省劳力。当然，切下凝胶进行提取是较安全的制备方法，即是说，它不象洗脱-PAGE 法那样，由于选择不合适的条件而使样品全部丢失。

以切片提取法分离单一成分时，要综合考虑所研究蛋白质区带与邻近区带分离的最适凝胶浓度。为了同时分离数种大小不同的成分，须凭经验找出平均的凝胶浓度，以便区带尽可能分布于全凝胶。原则上，具有与各种成分相适应的 T_{opt} 的“阶梯式凝胶”（step-function gels）看来是最适宜的。至少在凝胶的某一区带上能提供最适%T 的孔径梯度胶使数种蛋白质在平均孔径凝胶中相互之间分离[44,45]。



输出 2

曲线图解实例

A……A 的 *RF*　　　　(……A 的 *RF* 减去 2 个标准差

)……A 的 *RF* 加上 2 个标准差　　　　B……B 的 *RF*

<……B 的 *RF* 减去 2 个标准差　　　　>……B 的 *RF* 加上 2 个标准差

S……分离曲线　　　　8……δ *RF* 的标准差×11.79552

R……分辨曲线×1.4450

图 23　T-OPT 程序的输出格式(续)。用分辨率对%T[RRRRR] 作图以及用与制备性洗脱 PAGE 有关的 $T_{最大}$与%T[SSSSSS] 作图。

第 1 章已描述了制备性 PAGE 凝胶中蛋白质区带定位的方法。如果选用横切凝胶的方法,无论是隔膜切片器[31],或者是目前带有高频振动器的金属丝切片器商品(Hoefer),显然均适用于分离胶的切片。PAGE 分离胶(通常以 2—5%双丙烯酰胺交联、%T 的数值较大)切片的重复性比等速电泳或等电聚焦电泳的"非排阻性"凝胶要好[31],而且,它随%T 数值的增大而增加。虽然通过扩散作用可将蛋白质从凝胶中回收,但回收速度慢,且只能回收部分样品。因此,我们建议采用第 3 章等速电泳中所叙述的稳态堆积法来洗脱和浓缩蛋白质,但下列因素除外:

(i) PEGE 载样量比等速电泳小 1—2 个数量级。在典型的分离实验中,对于互相邻近的狭带,一般载样量为 0.1mg。若以聚丙烯酰胺为基质,用稳态堆积法提取和浓缩样品时,样品因吸附到聚丙烯酰胺上而引起损失[19]。因此,必须使浓缩胶的体积足够小,以便

满足样品与浓缩胶的体积为 1:2 的要求，需要有足够长度的凝胶，以便在电场下定量提取切片，同时也希望聚丙烯酰胺的吸附效应减至最小程度[19]，使每毫升凝胶的蛋白质不少于 0.2—0.3mg。若只有数毫克蛋白质，则减小带收集杯的凝胶漏斗的漏斗柄部分至与直径为 0.6cm 的凝胶管相适应[40,46]（第 3 章图 4）。

(ii) 与等电聚焦电泳相反，但与等速电泳一样，PAGE 形成的区带中的蛋白质是可溶的，因此，凝胶切片能直接用稳态堆积法提取，而不必预先进行溶解。又因为 PAGE 凝胶对蛋白质的扩散和移动的限制远比等速电泳大，所以电泳提取的时间更长，这取决于切片的凝胶浓度和蛋白质的不对称性。同时浓缩胶的体积也相应地增大(同理，用渗透法从 PAGE 切片中提取蛋白质不如从等速电泳的切片中有效，即便将渗透时间从几小时延长至几天，这取决于前已述及的诸因素，其产率也很少超过 70%），继稳态堆积和提取切片后，将电泳缓冲液换成挥发性缓冲液，再用凝胶过滤法将蛋白质与非蛋白质杂质分离并冰冻干燥[40]（第 3 章)。

连续区带洗脱

如需要从数毫克以上的混合物中分离出单一的蛋白质，则应采用制备性的洗脱-PAGE。参考文献中已描述了多种形式的制备性洗脱-PAGE 电泳仪[41]。若适当地考虑电泳仪涉及的物理原理和缓冲液特性，其中许多是能应用的。本文仅介绍一种洗脱-PAGE 电泳仪的操作方法(图 24)，它已用于本实验室[47,48]，同时也是可供选用的商品(Polyprep 200，凝胶横截面 20cm^2, Buchler Scientific Instrument)。鉴于 PAGE 载样量少 (0.1mg/cm^2 凝胶)，即使应用凝胶横截面为 20cm^2 左右的这种相当大的电泳仪(这里已提供了详细的方法)，也仅能纯化毫克量的蛋白质。因此，制备性洗脱-PAGE 应采用最大的凝胶表面面积，并对它维持恒温，也就是电泳仪越大，则电热耗散越有效。

有关洗脱-PAGE 的方法前文已述及[2]（参考文献 [19] 的附录 III)。

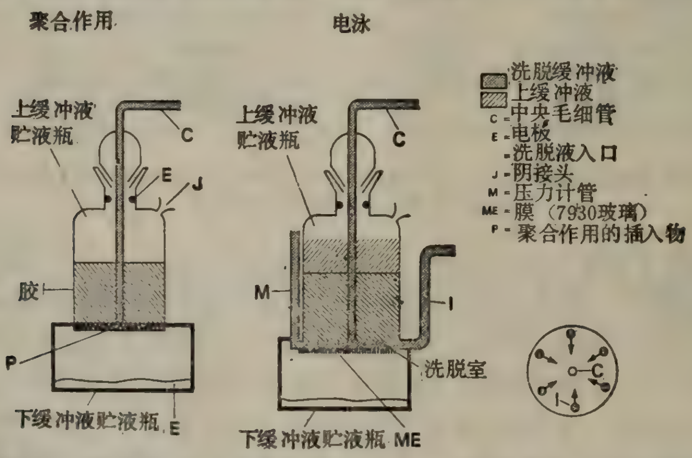


图 24　Polyprep-200 洗脱-PAGE 电泳仪 (Buchler Instruments) 图示。其设计的详细介绍见参考文献 [2,41,19] (附录 III)。聚合物隔板 (p) 与膜板 (ME) 依次安装在凝胶柱上。毛细管、凝胶柱和上缓冲液槽带有水夹层。

步骤 1：仪器的准备

凝胶柱底部安装一网状的聚合物 (P) 来封闭，聚合物的表面为十分光滑的聚丙烯，其

上形成下凝胶的表面。凝胶柱放置在下缓冲液槽上，下缓冲液槽放在收集器上。空气从中央毛细管(C)进入洗脱容器，关闭压力计管口（M)。为保证聚合混合物不进入毛细管，将毛细管内充满分离胶缓冲液。用止血钳夹住毛细管上部的洗脱液导管，毛细管轻压在聚合物上，绷紧网状接合物，使毛细管固定在中央位置，松开止血钳，观察毛细管的封闭情况。如果缓冲液流到聚合物上，则稍微加大毛细管对聚合物的压力，或者在毛细管底部的表面涂少许润滑剂(注意不要堵死毛细管)后，再绷紧网状接合物，仪器接上冷却系统但不通入冷却剂。仔细地校准电泳仪的垂直状态、确保区带与洗脱室平行，以便电泳时区带最后能泳入洗脱室中。

步骤 2：凝胶聚合

或长或短的分析性分离胶都在凝胶柱内聚合。由于每条蛋白质区带迁移到凝胶的底部须经历较长的时间，同时所用的大凝胶柱在电泳 10—15 小时后，其机械稳定性不良。所以凝胶长度应减至最小。为了使凝胶具有良好的器壁粘着力，最好选用 2% C_{Bis} 进行交联。凝胶柱内壁涂 Gelamide-250 (Polysciences) 以增加壁粘着力，这是值得采用的方法。显然，在聚合和电泳过程中需要强的器壁粘着力和维持凝胶的流体静力平衡。它们随凝胶的长度和浓度的减小而增强。应考虑使用最有效的分离胶浓度 (T_{max})，而不采用具有最佳分辨率的浓度 (T_{opt})（这对制备性洗脱 PAGE 分离条件实现最佳化是切实可行的[39]）。例如，在凝胶图谱中以邻近杂质的每一区带的凝胶浓度为函数作 T_{max} 的曲线图，可以使人们得到洗脱 PAGE 的最适的折衷的%T（图 23 标明-s-s-s-s-)。

最适分离胶的高度仍然需要凭借经验来确定。实验表明，在泳动界面前沿 ($R_f=1.0$) 洗脱后，在 5—6 小时之内将所需要的区带洗脱是合适的。在与凝胶机械稳定性相适应的限度内，调节凝胶长度以便能进行这样的快速洗脱。

设计洗脱 PAGE 分离胶的另一依据是凝胶的膨胀程度随电泳时间而变化。由于洗脱小室通常为 1mm 高，即便凝胶稍微膨胀也会堵塞洗脱室。为防止凝胶膨胀，可增大%C，但凝胶对器壁的粘着力下降。另一种方法是采用另一种交联剂，如用 DATD 代替双丙烯酰胺，这样可减小凝胶的膨胀。在实验前将分离胶聚合过夜也能使凝胶充分膨胀。然而，若洗脱时间为 5 小时且 T 小于 12%，则膨胀实际上不成为一个问题。但%T 的数值更大时，膨胀问题就值得注意。

将聚合混合物注入装在上缓冲液槽上的标准锥形阴接头 (J) 中，通过一根能自由通过密封在相应阳接头的橡皮塞上的硬而薄的塑料管(覆盖装置)将水覆盖在凝胶面上，再与适当的以 0.3—1.0ml/min 速度供水的泵相连，在不扰动聚合混合物表面的前提下，使水流尽可能大。注入聚合混合物后，立即以 1—3.5 l/min 的速度通入冷却剂。在聚合混合物的表面上有 2mm 高以上的水层时，中止覆盖水层。打开三盏同轴的聚合照明灯(说明见前文)。让聚合作用进行 1 小时，然后再用相同的方式在分离胶顶部聚合浓缩胶。

步骤 3：聚合物的去除

打开压力计管 (M) 和中央毛细管 (C)，将紧夹在装于实验固定架的环形座上的电泳仪提升到工作台之上，细心而又缓慢地抽出(无螺旋)聚合物，以避免给凝胶加压，因为这种压力不能迅速地通过狭窄的空气口 I 和 C 而排除。

步骤 4：洗脱室的形成

为形成高 1mm 的洗脱室，实验前先在下缓冲液槽内固定好玻璃隔板的位置，再将玻璃隔板放在四周有有机玻璃棱边的平面上，其上再放玻璃柱，反时针方向旋转半圈扣紧玻璃隔板，再覆盖约 1cm 高的洗脱缓冲液 I，用实验固定架将装置下降到下缓冲液槽(槽内充满下缓冲液)内。当凝胶柱降至下缓冲液槽时，须小心勿使空气残留在凝胶下面，待过量的洗脱缓冲液溢出至收集器中，如此即形成了洗脱室。拧紧固定在下缓冲液槽上端并间隔 90° 角的四个翼形螺旋，使凝胶柱与下缓冲液槽之间连接与空气隔绝，为使系统密闭，需将互相对应的螺旋连续而又缓慢地拧紧。松开支持凝胶柱的环形座上的夹子。

步骤 5：洗脱室的灌注

关闭中央毛细管 (C)，将电泳仪倾斜在实验台上，使压力管管底高于洗脱室的洗脱液的流入口，打开洗脱缓冲液 I(PHASE-BETA) 的流入口 (I)，并与盛在 Mariotte 瓶中的缓冲液 I 相连接，而 Mariotte 瓶悬挂在夹持凝胶柱的同一实验固定架的环形座上，升高 Mariotte 瓶，使洗脱缓冲液开始自动流入洗脱室中，洗脱室中的残留空气通过压力计管(M)或相邻的洗脱室溢水口逐渐排出，待压力计管充满缓冲液，将倾斜的电泳仪垂直放置，借助实验固定架调节 Mariotte 瓶的水平面，使压力计管 (M) 内洗脱缓冲液的液面与凝胶表面持平。此时洗脱室内充满缓冲液而无空气泡。凝胶呈静力平衡状态，再打开中央毛细管。

步骤 6：上缓冲液槽充液

将上缓冲液泵入或注入(小心不要破坏凝胶表面)接头 (J) 中，同时升高盛有洗脱缓冲液 I 的 Mariotte 瓶，使压力计管 (M) 内缓冲液与上缓冲液维持在同一水平面上，直至快将上缓冲液槽充满。此时，不得启动维持上缓冲液槽和一只二 1 的缓冲液瓶之间的上缓冲液再循环的泵。

步骤 7：下缓冲液的循环

将下缓冲液不断地泵入下缓冲液槽内，并用虹吸法吸出，由于这一型号的电泳仪的下缓冲液与玻璃隔膜 (ME) 接触，因此下缓冲液浓度实际上应尽可能高(为常用于分析水平的下缓冲液浓度的 3—10 倍)，以便防止由于“离子渗透性”不良的 Corning7930 玻璃膜所引起的洗脱室的 pH 变化。

步骤 8：洗脱液的流动

关闭压力计管，将中央毛细管 (C) 经导管与洗脱液泵相连。使洗脱室中的缓冲液以 1.2—1.5ml/分钟的流量吸入毛细管，连接毛细管和泵的导管，再进入泵内。待缓冲液进入泵中，打开压力计管，重新调节 Mariotte 瓶的高度，使在泵入洗脱缓冲液的过程中上缓冲液和压力计管的水位相同。

步骤 9：加样

如果样品量较小 (10—20ml)，用配料泵将样品加在凝胶表面上。如样品量大，将样

品逐渐地加到凝胶表面上。再细心地先用配料泵然后再用注射器（50ml）将上缓冲液覆盖在凝胶表面上，不得破坏样品-缓冲液之间的界面。样品可加至 200ml。再开始循环上缓冲液。

步骤 10：电泳

因为 1.5cm 厚的圆形凝胶散热能力比 0.6cm 的凝胶小，因此应控制电流在 40—50mA/cm^2 的范围，而不使用与凝胶表面成正比的电流（74mA）[19]。在分析性或制备性凝胶电泳中，电压应尽可能高但不超过仪器的散热能力，所以选用的电流大小取决于冷却剂的流速、操作的温度和仪器的设计。检查产热是否过多的方法是取出制备性凝胶并对蛋白质进行染色。若散热量适中，则环形带应精确地与整个凝胶的表面平行。如果散热不良，则蛋白质在凝胶中心的移动速度比在冷却四周的快。若应用有色蛋白质，如血红蛋白，来观察产热引起的效果，由于它超常的溶解度和耐热的性质，将导致作出错误的结论。

待以示踪染料标记的堆积前沿到达洗脱室时，用洗脱缓冲液 II（PHASE ZETA）代替洗脱缓冲液 I（PHASE BETA）。为了方便和消除对凝胶的压力变化，将两种缓冲液并排地夹紧在同一实验固定架上，并保持在同一水平面上，用一根 Y 形管将两缓冲液连接起来，这样从一种缓冲液换成另一种缓冲液仅仅只需改变夹管的位置。

洗脱缓冲液 I 和 II 的制备需进一步讨论。将洗脱缓冲液的 pH 调节到在洗脱室中与洗脱缓冲液相接触的凝胶缓冲液的 pH，即开始时为 PHASE BETA，至堆积区到达洗脱室时为 PHASE ZETA。然而，无论在 pH（BETA）或（ZETA），洗脱缓冲液仅含共同成分 C_6，而不需任何特殊的 C_6 的平衡离子，因为平衡离子不进入凝胶。象下缓冲液一样，通常利用 Cl^- 或 K^+ 作为洗脱缓冲液内的 C_6 的平衡离子。制备洗脱缓冲液涉及的另一问题是防止蛋白质在从洗脱室中流出以前，迅速通过玻璃隔膜。通过增加洗脱缓冲液的离子强度可以减慢洗脱室中蛋白质的移动速度。通常它们的浓度比相接触的凝胶相大 3—5 倍。

步骤 11：洗脱液的检测和回收

考虑到 PAGE 的载样量，即每平方厘米凝胶 0.1mg，流速为 1ml/min 的洗脱液不可能象在常规的层析中一样，用分光光度计检测。如将洗脱速度由 1.0ml/min 减小到 0.1ml/min，洗脱液 R_f 值也同时减小，虽稍能降低稀释的程度[48]，但仍不能满足对洗脱液进行连续光学检测的需要。较好的方法是取 0.1ml 洗脱液再电泳，以检测洗脱液中所研究的蛋白质，除非它能通过分析或用同位素分析法测出[2]。已设计出能大量浓缩的装置以用于制备性洗脱 PAGE，它能通过稳态堆积法[49]将 30—100ml 的蛋白质洗脱液浓缩至 1ml 的收集杯中，但是用透析膜代替玻璃隔膜所设计的收集杯[46]看来较好。

第3章　等速凝胶电泳

Nga Y. Nguyen 和 Andreas Chrambach

引　　言

等速电泳与等电聚焦电泳相似，属于一种“电荷分级分离”方法，也就是说它对不同分子的分离主要是由于分子的净电荷不同，而不是由于分子的大小不同。因此，应用等速电泳于特定的分离问题，其基础是由 PAGE 中 Ferguson 曲线图（第 2 章第 79 页）分析测定的最适孔径，尤其是在 T 的百分浓度为零时所确定的孔径（第 92 页）。

术语等速电泳[1] 是稳态堆积[2] 或不连续区带电泳（MZE）（见参考文献［3］，第 2 章）的同义语。但实际上有区别地利用这些术语是合适的：稳态堆积是将所研究的蛋白质限定在泳动界面内（“选择性地堆积”），而另一些（“未堆积的”）蛋白质仍保持在堆积区以外，或使所研究的蛋白质选择性地排阻在堆积区以外（“选择性地不堆积”），而将杂蛋白质限定在泳动界面内来达到分级分离的；等速电泳则是将要分离的蛋白质和其污染物都堆积在堆积区之中。

用等速电泳方法很容易将两种蛋白质堆积起来而加以分离。然而，由于蛋白质以连接的形式堆积起来，所以不可能在 PAGE 分析水平上，即在微克量水平上进行分离。这点是真实的，除非人们能找到一种在两种蛋白质之间移动的小分子物质（“间隔物”）。由于人们通常不能找到这类间隔物，又由于在稳态实验的时间内和实验中能获得的移动路程上不能分离出足够数量的需要的多种间隔物[4,5]，所以我们在讨论分离操作时将不考虑利用间隔物。为了进行凝胶的等速电泳分离，即使利用标准的分析规模的 PAGE 电泳仪，也需要毫克量的蛋白质。因此，本章介绍的等速电泳分离蛋白质仅属制备性的，且限于应用毫克量范围的分离。若不如此，人们必须用在无凝胶下按比例减小至毛细管的电泳装置[1]。然而，这样应用目前看来是困难的，因为缺少特殊的间隔物，不能检测堆积的前沿和后尾，也检测不出堆积区的前沿和后沿，以及在堆积区中特殊移动的蛋白质区带。所以本文中我们不讨论微克量蛋白质的分析性水平的毛细管等速电泳[1]。

本文也讨论以上述严格意义所确定的并作为电荷分级分离方法已应用于制备性电泳的稳态堆积法。

操　作　程　序

稳态堆积条件的最佳化

蛋白质等速电泳的第一步是将欲分离的蛋白质堆积。第 2 章所叙述的原理和方法也用来选择最适条件，以便确定 pH、堆积界限和维持天然蛋白质的稳定性的其它重要条件，同时也用来选择电泳仪和凝胶，这里仅补充几点说明：

(i) 用于等速电泳时的最适 pH 的要求比稳态堆积更高。即它将应用 Jovin 输出（第 2 章)的最小 pH (对阴离子系统)或最大 pH (对阳离子系统)各自的子系统。

(ii) 注意堆积区的 pH 梯度的陡度，即堆积界限 RM(2, BETA) 和 RM(1, ZETA) 之间的差别。 对等速电泳分离而言,这类参数的差别不大,因此 pH 梯度平坦是合适的,这与等电聚焦电泳类似,看来是最适宜的[6]。在这一条件下，堆积区内的缓冲能力也最强。

(iii) 由于等速电泳与 PAGE 不同,它无分离胶支持，所以其“非排阻性的”浓缩胶应象等电聚焦一样，具有最大的机械稳定性。因此,凝胶应以 DATD(在 0—4℃) 交联[7]，在经甲醇性氢氧化钾清洗的、涂有 Gelamide 250(Polysciences) 的硬质玻璃管中成胶并象等电聚焦一样 (参考文献 [7] 和第 4 章) 以尼龙网支持。 等速电泳通常所用的凝胶 T 为 5%，C_{DATD} 为 15%，对分子量高达 5×10^5 的分子表现为“非排阻性的” (图 1)。

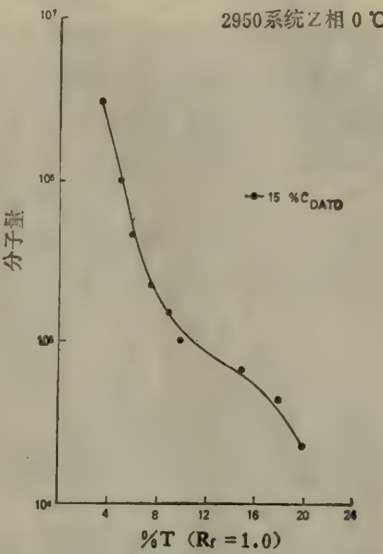


图 1　15%C_{DATD} 交联的聚丙烯酰胺对不同分子量 (MW) 蛋白质的“非排阻性”。把具有 $R_f = 1.0$ 的最大凝胶浓度 (%T) 看成是 “非排阻性的” [缓冲液系 2950，PHASE ZETA pH 10.45，RM(1, ZETA) = 0.064,0℃][7]。

堆积区内的分离试验

一旦待分离的蛋白质在最适 pH、最小的堆积界限的范围内,以及在维持活性所必需的各种因素下堆积后，其堆积的长度以两种方式增加：增加蛋白质的加样量及减小离子强度。然后切下堆积区,切片并利用切片分析法鉴定分离程度。

(i) 蛋白质加样量　直径为 0.6cm 的凝胶可望加 15mg 的蛋白质。 蛋白质加样量的增大，由于堆积区蛋白质浓度受限制，将引起堆积区的扩展[3,4]。电泳的时间和达到稳态分离所经历的距离二者均随蛋白质加样量的增大而增加(也随蛋白质成分的复杂化而增长),所以须应用长凝胶管。实际上，内径 0.6cm、长 50cm 的硬质玻璃管及第 2 章图 1 所描述的电泳仪并带有高 60cm 的下缓冲液贮液槽(同一图中的 A 部件)是最适合的。

蛋白质加样量大也影响所选用的电压。当向系统 (凝胶和电解质缓冲液)加 100V 以上的电压时，堆积区的蛋白质很容易热变性且开始絮凝。这可能是由于堆积区的高浓度蛋白质 (20—100mg/ml) 与水和盐相结合的结果[4]。一旦发现絮凝，迅速降低电压，常能使絮凝现象消失。

(ii) 工作堆积胶的离子强度 (PHASE ZETA)　当离子强度减至最小值 0.0020 时，堆积区的长度变得最长[4]。借助于减低 ION. STR (ZETA) 到预期的 0.0020 所需要的系数 (第 2 章图 4)，来稀释堆积胶缓冲液 (PHASE BETA)。若离子强度减小到此值以下，显然要破坏稳态(即清晰的区带界面)，这可能是由于蛋白质的缓冲能力和导电能力变得比缓冲剂的相应能力更重要[4]。

(iii) 电泳　除了在电泳过程中间隙地测定凝胶管中堆积的长度来判定稳态的终点外，电泳系按照稳态堆积的方式进行。因为蛋白质高浓度堆积时，自身显淡黄色，又因“延续堆积区”的边缘清晰，而且示综染料常常标志这些边缘，尤其是边缘的前沿，所以堆积的长度很易看出。当延续堆积区的长度达到恒定时，可判断已达稳定态，便停止电泳。

(iv) 延续堆积胶的切片　在延续堆积区上下数厘米处切断凝胶管，从管中取凝胶，其方法与第 1 及 2 章所叙述的方法相同。然后将凝胶切成 1mm 的薄片。看来，具有低频振荡器的金属丝切片器（hoefer scientific）适合于切 DATD 交联的凝胶[8]。用切片或部分切片洗脱液或两者兼用来分析 PAGE 的蛋白质图谱。垂直板凝胶电泳仪适用于这一目的。图 2 表明了对含有各种电荷异构的人生长激素同功激素的延续堆积胶（0.6cm 凝胶）所作的典型分析结果[4,9]。各种蛋白质之间的分离为渐进性的，表明堆积成分的分离呈重叠分布[10]。尽管如此，在第 14 和 15 切片之间的主要蛋白质 B 清晰地与 C 分离。因此，在第 15 和 24 切片之间得到了均一的 B 组分。同样，在第 10 和 9 切片中，组分 C 和组分 D 分离良好。但是，在任何切片中，C 不能与 B 完全分离。混合物内组分 B 含量居多，其分布的宽度与邻近的其它同功激素相重叠，仅 E 组分除外（第 2—5 切片，图 2 未指出）。

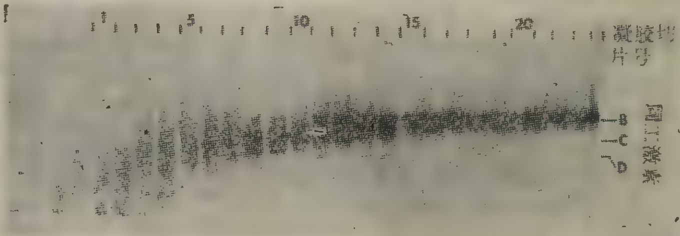


图 2　用等速电泳分离的蛋白质再用 PAGE 电泳的分析结果。35 mg 人生长激素在长 50cm、直径 0.6cm 凝胶（T 5%，C_{DATD} 15%）上，以 MZE 1954.4 缓冲系统于 0—4℃下进行等速电泳[4]。

凝胶切片提取法进行制备性等速电泳

已经指出，堆积区内的分离试验必须在毫克水平的蛋白质上进行，即制备规模的水平。但是等速电泳可使用直径更大的凝胶，加入更多的制备量的样品。实际上，凝胶的直径需要与合理的电泳速度及电泳仪的散热能力相适应，最大不得超过 1.8cm[9]。

电泳分离和凝胶切片

直径为 1.8cm 堆积胶的电泳方法与直径为 0.6cm 的凝胶几乎完全相同，但有一点例外，即为了防止蛋白质在延续堆积胶内发生絮凝，电泳时的电压通常须低于直径较小的凝胶。蛋白质的加样量与凝胶的表面面积成正比，因此 1.8cm 凝胶的加样量可以比 0.6cm 的凝胶大一个数量级，一般约 150mg[9]。由于第 2 章描述的上缓冲液贮液槽（图 1，c）可容纳 6 根直径为 1.8cm 的凝胶管，所以每次电泳能分级分离 1g 蛋白质，因此利用一个小的普通的 PAGE 电泳仪几乎可以进行工业规模的分离。

切断直径较大的凝胶管和凝胶需特殊的方法和装置。为了在凝胶管堆积区上下几厘米处切断凝胶管，用三棱锉刀在管的四周刻一道痕，再将在煤气的氧焰上烧至灼热的硬

质玻棒插进刻痕内，令管断裂，最好用一种前文所述的按比例增大的金属丝切片器(图 3)，将含有堆积蛋白质的凝胶切成 1—2mm 的切片[1]。

方法中与堆积胶分离试验唯一不同的是蛋白质的回收问题。

蛋白质的回收过程

步骤 1：切片的分析和收集

将凝胶切片悬浮于缓冲液中，用 5μl 扩散洗脱液作凝胶电泳或等电聚焦电泳分析，其余的扩散洗脱液和切片则保存于 4℃。根据凝胶图谱的分析结果，收集切片。将收集的凝胶切片加入漏斗形稳态堆积胶的装置中，这是一种为把堆积的蛋白质收集在含缓冲液的小杯中而设计的装置，以便从切片上电泳提取和浓缩提取液（参考文献 [12]，见下文步骤 3)。

步骤 2：选择稳态浓缩胶以提取和浓缩切片中的蛋白质

按前述方法和参考文献 [13] 选择稳态堆积系统，以便所研究的蛋白质在其稳定的 pH 和离子强度下堆积。由于这一步不涉及纯化作用，所以根据另一判断标准来选择堆积界限：即能提供一个快速的界面转移速度，那就是选择与堆积蛋白质相协调的，堆积蛋白质在该 pH 条件下是稳定的 RM(2,BETA) 和 RM(1,ZETA) 的最高值。

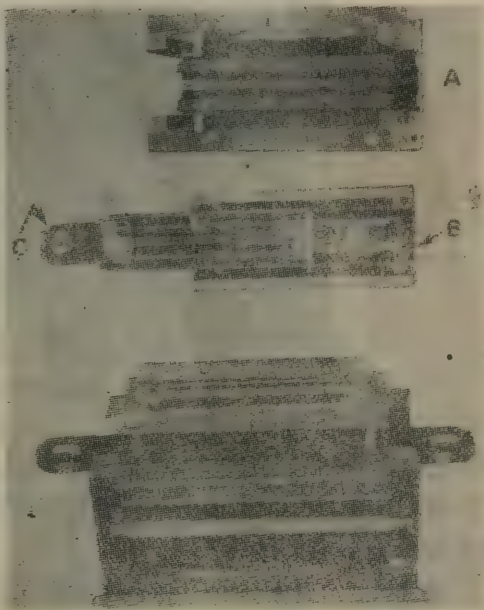


图 3　用于直径为 1.8cm 的等速电泳凝胶的金属丝切片器。设计见参考文献 [11]（目前 MRA Corporation 已生产)，适用于切直径更大的凝胶。A，有槽的凝胶支持物；B，金属丝格；C，切片支持盘。

步骤 3：电泳仪的装配[12]

首先试验浓缩漏斗，以确保其不渗漏。将圆形透析膜（厚 0.005cm，直径 4cm）润湿，用塑料圈将膜紧绷在收集杯的底部(图 4)，漏斗垂直地插入倒放在滤纸片上的收集杯中，里面装满水并放置 1 小时，如 1 小时后滤纸仍保持干燥，表明收集杯不漏水，再轻轻地将收集杯与漏斗拆开。

其次，将浓缩漏斗涂一层琼脂糖。在装有空气冷凝器的烧瓶中于沸水浴加热至 80℃，制备 1% w/v 琼脂糖(无电内渗现象，例如 Iso-Gel，Marine Colloids) 溶液。将此溶液加于已在 60℃烤箱中预热的硬质玻璃制成的浓缩漏斗内，令其流下，漏斗于 60℃加热至少 3 小时以烤干漏斗壁。在图 4 描述的电泳仪浓缩漏斗中，以选定的凝胶缓冲液配成 0.75% 琼脂糖制备浓缩胶。其步骤如下：按上法制备 1% 琼脂糖溶液，以 3:1 的体积比与预热至 60℃的凝胶缓冲液混合，室温下将混合液倒入涂有琼脂糖的浓缩漏斗中（底部以蜡膜密封)，放置 1～2 小时以形成凝胶。凝胶体积至少为样品体积的 3 倍，实际上，通常将凝胶加至漏斗柄上 2cm 即已足够。随即用浓缩胶缓冲液覆盖琼脂糖凝胶，并放置过夜。

近来经验表明，琼脂糖可能干扰某些 MZE 缓冲系统的实验，因此可能需要用凝胶切片提取法并以聚丙烯酰胺基质代替琼脂糖；通过稳态堆积来浓缩蛋白质。浓缩漏斗的涂

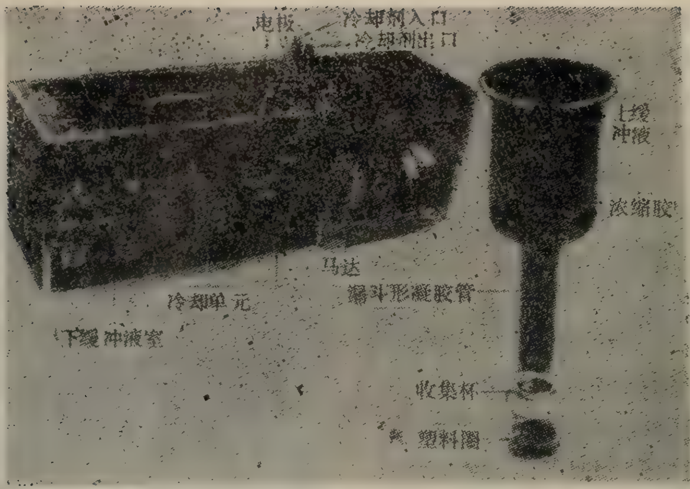


图 4　从凝胶切片中提取和浓缩蛋白质的电泳仪[12]。

布和凝胶浓度的选择遵循前述第 (iii) 节指出的关于稳态堆积的最适条件的原理和方法。

待琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶形成后，去除蜡膜，装有凝胶的漏斗悬挂在电泳仪的下缓冲液 (0—4℃)中(图 4)。

步骤 4：用稳态堆积法从凝胶切片中电泳提取和浓缩蛋白质[9]

将示踪染料加入到由凝胶切片和含 10% 蔗糖的缓冲扩散液组成的样品内，上槽电极铂丝弯至样品上 1cm 处 (图 4)。然后细心加样，但不得扰动上缓冲液和样品之间的分界面加样，可徒手操作注射器或用多道配料泵同时将缓冲液输入到数个漏斗中来完成。当上缓冲液加至电极时，打开电源并继续加入上缓冲液直至漏斗形槽充满为止，此时未装收集杯，以每平方厘米凝胶 6—7mA 的电流开始进行电泳。当以示踪染料标记的提取和浓缩蛋白质堆积区域距漏斗底 0.5cm 时装上收集杯，细心地将倒置的漏斗柄垂直地插入小杯中，然后减慢速度，通常将电流调至每平方厘米凝胶 3.0—3.5mA，继续电泳，加在系统的电压为 50V。当堆积区进入洗脱杯后再电泳 2—3 小时。用巴斯德吸管收集杯内(杯的体积 1 ml，柄的内径 1.3cm，外径 1.5cm，若柄为 0.6cm，则体积相应减小)的溶液，并用凝胶过滤法纯化。为收集第二批样品，可控制电流在较低的条件下继续电泳过夜。

步骤 5：除去杂质和交换挥发性缓冲液来纯化浓缩物

Sephadex G-50 (中等粒度) 于沸水中或者最好是在索氏提取器 (Soxhlet) 中于 100℃ 连续提取 24 小时，以除去可溶性的葡聚糖[6]。再混悬于 0.02mol/L NH_4HCO_3 中 (pH8.0)，它由 NH_4OH 和 CO_2 合成(能彻底冰冻干燥)，再装入 60 × 0.9cm 的柱中并平衡，以蓝色葡聚糖测定外体积。上柱的浓缩液体积不超过 1—2ml。蛋白质在外体积内洗脱，并冰冻干燥。

从等速电泳后的凝胶切片上分离蛋白质的方法，有两点与 PAGE 或等电聚焦电泳后的凝胶切片不同:

(i) 等速电泳加样量很高，以致用稳态堆积法从切片中提取和浓缩蛋白质时，尽管凝胶体积相当大 (10—30ml)，也不必担心蛋白质吸附在凝胶上而遭到的损失。只有当表面积为 1.32cm²(柄上)的每一漏斗加样量减少至数毫克蛋白质时，在稳态堆积时由吸附造成

的损失才增至 20—30%[14]。当然,这种损失可通过降低凝胶的直径和体积来补偿。

(ii) 等速电泳区带中蛋白质高度浓缩，但不沉淀，而等电聚焦电泳中等电区带则相反,因此前者不必在提取前溶解。

这种从等速电泳凝胶切片上分离蛋白质的方法，一般情况下，产物的回收率可达70%，而纯度为 90%[9]。

用连续区带洗脱法进行制备性等速电泳

电泳仪

参考文献中记载了多种形式的制备性洗脱 PAGE 电泳仪[15]。介绍这些仪器所涉及的物理学原理和缓冲液特性,其中许多是可用的。本实验室使用的电泳仪是 Buchler Polyrep 200 (凝胶截面积为 20cm²，Buchler Scientific Instruments)。

由于堆积区中的蛋白质浓度高(20—100mg/ml)，这种电泳仪(第 2 章图 24)在 PAGE 为毫克量制备时,用在等速电泳可达克制备量,这属于小规模的试验性工业生产[4]。因此,除非所研究的蛋白质数量很大,否则必须减小凝胶的截面积。等速电泳中一根直径仅为 3mm 的凝胶柱便能分离毫克数量的血红蛋白[16]。虽然很少应用如此大小的电泳仪，但易于装配,用一只流动池 (crossflow-cell) 连接到分析规模的凝胶管的底部即成 (Hoefer Instruments 或 Savant Instruments)。

方法学

等速电泳的洗脱方法基本上遵循前文已介绍过的用于制备性 PAGE 的连续性区带洗脱法(第 2 章,参考文献 [11] 的附录 III),但有一点不同，即应用了一种凝胶，即堆积胶。参考文献 [4] 报道了将这一方法应用于等速电泳对典型蛋白质和人生长激素同功激素的分离。

在最适的 pH 及堆积界限、离子强度为 0.0020 和辅助因子最适宜的条件下制备最长的凝胶 (polyprep 200 装置中为 200ml)。其制备方法与制备分析规模的浓缩胶的详细步骤相同;不同之处是三种贮备液(单体、浓缩胶缓冲液及起动剂，见第 2 章图 8) 的温度须更严格地控制在聚合时的温度,一般为 0—2℃。蛋白质在堆积区的浓度达 20—100mg/ml 时具有膨胀堆积区的特性,这可能是由于摄取了渗透水的结果,因此,使用以 DATD 交联的弹性胶(通常 T 为 5%，C_{DATD} 为 15%)，这种凝胶在膨胀的堆积区通过时和通过后仍能维持与器壁的粘着力。

在 100—150V 电压(可调)下进行电泳，应同时观察堆积区有无絮凝发生，如果堆积区出现热沉淀,则减小电压使其消失。

在制备性洗脱等速电泳中，洗脱液的分析只能是对洗脱液进行分析性 PAGE 或作特殊的测定,然而,与洗脱 PAGE 相反，洗脱液的凝胶分析图谱并不直接代表制备时所分离的同荷异构蛋白,也不代表等速电泳所分离的每一区带内大小各异的异构体,因此，从制备性等速电泳凝胶中洗脱的同荷异构体的 PAGE 图谱,由于蛋白质的各种寡聚体的存在,因而显现出不均一性。这点可用 2g 卵清蛋白和 2g 牛血清白蛋白混合物的洗脱图谱来说明(图 5)[4]。从 PAGE 中观察到的这两种蛋白质并不象人们根据等速电泳图谱或理论[3]所预料的那样分离成清晰的区带,而呈狭窄的重叠分布,这与分析性等速电泳的研究结果

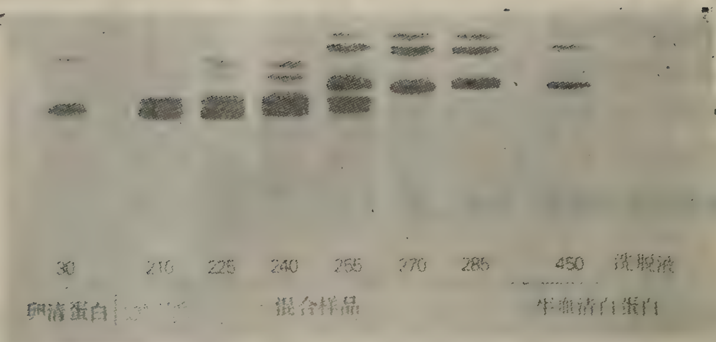


图5 用PAGE分析从制备性洗脱等速电泳实验中获得的洗脱液(毫升)。2g牛血清白蛋白和2g卵清蛋白混合物加在200ml凝胶柱上(T为5%，C_{DATD}为15%)，并以MZE 2365为缓冲系统，在0—4℃下洗脱，洗脱速度1.5ml/min[4]。

相一致[10]。尽管如此，这种混合区带仍然不超过区带长度的10%，与系统内大量的蛋白质样品相比可忽略不计。

连续区带洗脱法进行制备性稳态堆积

制备性稳态堆积可选择性地堆积比所研究的蛋白质移动更快的杂质，并在洗脱PAGE的电泳仪中(见前文)洗脱下含杂质的堆积区，然后再堆积所研究的未堆积的蛋白质成为一条浓缩的区带(第二次堆积)，在开始堆积后即洗脱[17]。制备性再堆积的方法与第2章描述的制备性PAGE方法几乎完全相同，不同之处是连续使用两种上槽缓冲液(PHASE ZETA和TAU)，相应的洗脱缓冲液由PHASES PI和PSI组成(第2章图7)。

从Jovin输出第3页的RESTACKING PARAMETERS表中(第2章图7)选择出将赶上未堆积蛋白质移动的第二泳动界面。此时，下堆积界限以RM(7, PSI)标明，并使所研究的蛋白质在RM(7, PSI)界面内再堆积。根据经验，这种选择按上述蛋白质堆积的方法进行。通过选择堆积界限或分子筛或二者兼用的方法，使蛋白质在缓冲液系统中不堆积，电泳一段时间后(由经验决定)，用与所选择的再堆积系统有关的PHASE TAU中的组分之一取代上槽缓冲液，新组成的上缓冲液在泳动中形成第二泳动界面而再堆积蛋白质，在堆积区以浓缩的方式洗下蛋白质。

应该注意：上述方法只能应用于在再堆积所研究的蛋白质时不存在与其共同堆积的杂蛋白质[17]。在相反的意义上说，稳态堆积法用在制备性的工作中也可选择性地堆积所研究的蛋白质，而不堆积杂蛋白质。但至今尚未见这类报道。

第4章　分析和制备性凝胶聚焦电泳

Birgit An Der Lan 和 Andreas Chrambach

应用凝胶聚焦电泳的时机

与等速电泳(第 3 章)一样，聚焦电泳也是一种用于分离具有不同净电荷数分子[‘带电异构物’(‘charge isomers’)] 的方法：即蛋白质在 pH 梯度中泳动，并依据各自的等电点(pI)进行分离。正如第 2 章所述及的那样，也存在某些实例，它们与仅依靠分子的净电荷即可获得最佳分离效果的“电荷异构现象”(“charge isomerism”)不同。在这类实例中，待分离蛋白质的分子大小和净电荷均不相同，但与其它任何浓度的凝胶比较，它们在 %T = 0 时的分离效果最佳(见第 2 章图 4)。

在这类实例中，应用等电聚焦电泳而不采用等速电泳的理由有四方面：

(i) 与等速电泳不同，聚焦电泳分离的蛋白质区带是不连续的，因此，可以通过染色法观察而不必经第 2 向或其它分离步骤。

(ii) 应用等速电泳时，系统所含的组分越多，为达到稳定状态所需要的时间和泳动的距离也越长。在聚焦电泳中，达到稳定状态所需的路径长度及时间与加到凝胶上的蛋白质种类和数量无关。也许这是由于一旦载体的组分达到稳定状态，聚焦能应用的电压梯度较等速电泳高；也可能是在稳定状态下电流小，结果在相等的电压条件下热效应小的缘故。

(iii) 不需要预先了解或系统测定待研究蛋白质的带电性质。

(iv) 聚焦电泳操作不需要专门的物理化学知识。

然而，聚焦电泳也具有等速电泳所不具备的问题：

(i) 蛋白质在等电点或其附近具有沉淀的倾向。在液相基质中，能引起蛋白质沉积，在凝胶中至少阻止蛋白质达到其等电点区域。蛋白质在等电点区域的不溶性也使得从凝胶中分离出蛋白质比等速电泳更困难。

(ii) 载体组分分配不均匀将引起某些区域电热效应增强，pH 梯度中各部分的电压梯度的不同也妨碍了聚焦电泳的数据应用于蛋白质的物化分析。

(iii) 聚焦电泳处于稳定状态时，其离子强度一般至少比等速电泳小一个数量级。如此低的离子强度有利于蛋白质和载体组分之间、各蛋白质之间或者蛋白质与核酸之类的其它大分子之间以离子键的形式发生意外的结合。这些相互作用可以改变蛋白质的表观等电点(apparent PI)。

(iv) 或许由于应用了较高的电压梯度，聚焦电泳的稳定状态比等速电泳衰变更快。

(v) 蛋白质到达等电状态的速度取决于它的滴定曲线的形状。滴定曲线在接近其等电点附近位置时，呈平坦形状的蛋白质在 pH 梯度中不能到达其等电区域。

然而一般说来，与等速电泳相比较，聚焦电泳的优点胜过其缺点，特别是在分析工作

中。

仪　　器

柱胶与水平板胶装置

聚焦电泳的随时检测　　聚焦电泳是在“自然的”pH 梯度下进行的电泳，“自然的”pH 梯度由电场产生，而不是由梯度发生器制备。这种 pH 梯度是不稳定的；一旦产生，立即开始衰变而无稳定状态存在。从 pH 梯度的“动力学”考察，在电聚焦的过程中，蛋白质之间的分离也在不断地变化。因此，最佳的分离只能在各个不同时间中通过检测凝胶来决定，多柱胶电泳仪容许在不同时间里分析某一柱胶上的蛋白质区带图形及 pH 梯度，而不干扰其它柱胶。可是无论是 pH 梯度的动态变化还是蛋白质区带图形，都不容易在水平的或垂直的板电泳仪上检测[1]。然而，对于特定的 pH 梯度及蛋白质的分离而言，一旦确定了最适宜的时间，假定蛋白质样品在一个小的样品体积（<100μl）中能达到足够的浓度，则板电泳仪有利于对不同样品的蛋白区带进行比较。至今，水平板电泳仪几乎常用于这一目的。由于在电聚焦中 pH 的梯度的均一性和稳定性仍然存在着问题，目前应用垂直板电泳尚存在着困难。

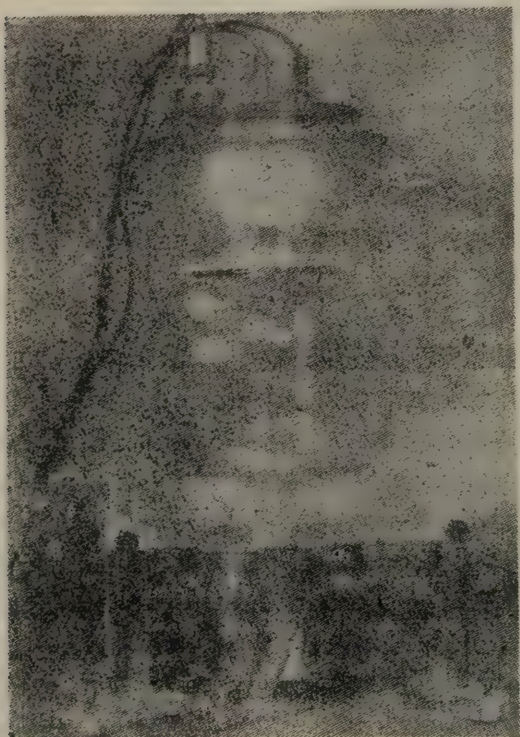


图 1　柱胶电泳仪。详细说明见第 2 章图 1。需要时可提供工艺图(第 2 章图 1 的 A—D)。

仪器的材料。直到最近，柱电泳仪中存在的问题是在聚焦电泳中常用的阳极强酸性电解液和阴极强碱性电解液的条件下，塑料及其连接处不牢固。因而迫使人们去制备全玻璃电泳仪（见第 2 章和参考文献 [1]）。自从出现了弱酸和弱碱的阳极与阴极电解液之后，这一观点尚在争议中，但是由于玻璃稳定，也不存在粘接、泄漏及在长期使用中起雾和龟裂等问题，所以直到现在还在吸引着人们。图 1 为一种适用于聚焦电泳的装置(参阅第 2 章图 1)。

凝胶的机械稳定性　　聚焦电泳中凝胶的膨胀与 pH 有关，因此与等速电泳比较，粘壁的问题更为突出。虽然在水平板电泳仪中这一问题并不存在，但在柱电泳仪中却成为问题。但是，可以用在浓缩胶中所应用的相同操作来弥补(见第 2，3 章)，即凝胶的流体静力平衡、聚合温度与电泳温度以及凝胶的机械支持物的温度相同，用强碱洗涤玻璃表面使极性增至最大，用线状的聚丙烯酰胺覆盖凝胶管，以及采用具有良好弹性及壁粘着性质的凝胶。如果采用了这些方法，粘壁现象对聚焦电泳是适宜的。粘壁现象最好通过阳极

电解液和阴极电解液在电泳仪中互换位置来检查；若粘壁现象仍然存在，则梯度的形状和范围不受影响（见下文及参考文献[2]）。

散热　聚焦电泳时，分辨率随电压增加而改善。然而，增加电压的代价是增加了电热。因此分辨率决定于电泳仪的散热能力。在人们考虑到整个梯度的各部分导电性不均一时，这点尤为重要。当梯度一旦形成，全电流可能是低的，但在经过某一载体组分特有的电聚焦时间后，各种类型的 pH 梯度中已表明均能形成导电性最大的区域必然局部发热[3,4]。因此，电泳仪的传热能力越好，这类问题就越少。在这方面，柱电泳仪比任何形式的水平板电泳仪更有效，因为凝胶管完全被温度受到控制且不断搅动着的液体包围着，同时凝胶与液体相隔仅 1mm。由于板电泳仪的凝胶极薄，凝胶的面积与质量的比值增大，因此水平板胶的散热优于柱胶。但是大多数水平板胶的热量只能从一个表面上散出。在这类电泳仪中，总是用几层具有不同传热性质的材料将凝胶与冷却表面隔开，这些材料为铝/水/玻璃，在某些设计不良的型号中甚至用塑料/空气/塑料。冷却水平板胶最有效的方法是采用 Peltier 冷却器，其上配备有最近发展的氧化铍板（MRA 公司），通过一薄层塑料（Marine Colloids Div. FMC 公司的“凝胶带”）与凝胶隔开。

板电泳仪的其它问题　水平板电泳仪具有柱电泳仪所不具备的某些问题：

(i) 板胶朝向空气的表面能吸收 CO_2，因而可能影响 pH。

(ii) 由于在聚焦电泳的全部过程中难以保持水蒸汽处于饱和状态，潮湿的空气不断从凝胶表面逸出，局部地区失水则增加该地区电压，结果造成蛋白质区带扭曲，同时也改变了凝胶的结构，即形成“通道”或丧失通透性。

(iii) 电极和纸芯与凝胶的接触可能不均匀，结果引起整个凝胶的电场强度不均一；此外，纸芯的某些区域可能干燥。

(iv) 与柱电泳仪比较，样品体积更受限制，因为样品不是加在凝胶的窄缝内，就是吸附在滤纸条上，而 0.6cm 直径的柱胶可加样 0.5—1.0ml。

(v) 除非凝胶仪水平位置安放良好，否则阳极和阴极电解液贮液槽之间通过凝胶将发生虹吸作用。

(vi) 有些电泳仪的电解液贮液槽太小，因而不能使用难溶的和(或)弱电解质（见下文）。

熟练而灵巧的操作也许能克服水平板电泳方法中遇到的这些困难，但是这些困难在水平凝胶所获得的大多数图形中有所反映，表现为凝胶中的各条轨道区带的迁移距离不均一和区带的不对称性。

电压控制装置

当人们使用电聚焦凝胶的末端载体组分，即弱电解质作阳极和阴极电解液时，控制凝胶本身而不是电解液和凝胶的电压就显得极为重要(理由如下)。若人们利用几个同样的凝胶，则电压的监测系通过二根屏蔽的铂金丝穿过上贮液槽，分别与一根凝胶的上底和下底相接触来实现（图 2）。下部的铂金丝插入该凝胶管邻近的小孔中并弯成一个角度以便与凝胶底部相连接；上部的铂金丝经电极固定板的小孔直插入管中，并用固定板上的尼龙螺钉固定呈垂直状态[5]。作者的实验室已设计出一种改进的电源电压装置，用来控制加于凝胶上的电压，同时在电聚焦过程中能对缓冲液的电导变化作出相应的补偿（An der

Lan, B., Chidakel, B. E. 和 Chrambach, A.)。

梯度监测装置

测定 pH 梯度不需要特殊的装置。可以用刀片,通过眼睛或尺子测量，将凝胶切成 8 或 16 片。切片在脱气的 KCl 稀溶液（如 0.025mol/L）中浸泡 30 分钟即可测定 pH。两性电解质载体的浓度、温度、粘度以及 CO_2 的吸收对 pH 值的影响通常可以忽略不计;尽管上述因素可引起 pH 值的误差达百分之几,对于大多数的研究,这种忽略是恰当的，因为实际上聚焦电泳的目的是使各蛋白质达到一恒定的 pH 区域，并得到最佳的分离，而不是对它们的等电点作精确的物理化学测定。

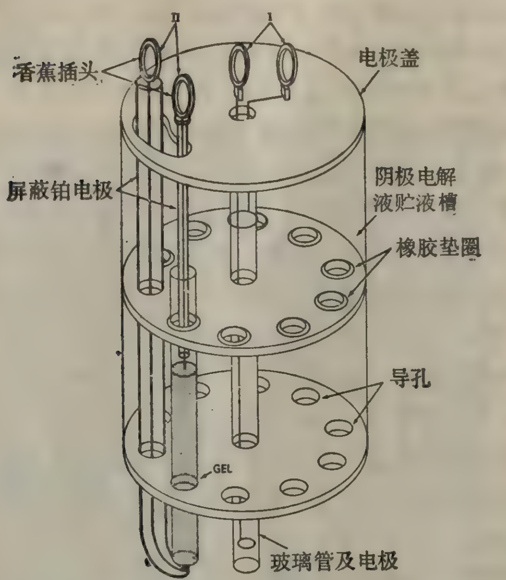


图 2　在应用弱酸为阳极电解液与弱碱为阴极电解液的聚焦电泳中监测电极与电源的连接。电极 I 和 II 连接到改进的电源上以控制凝胶的电压，而与电极液贮液槽中的电压降无关。若用未经改进的电源供电，则只通过电极 II 与电源连接,此时监测电极 I 与另一伏特计连接。

若测定凝胶的 pH 梯度确属必要，而凝胶随即被染色或分析，或若在不同的时间里必须对数种 pH 梯度进行测定，最方便的方法是利用接触电极（DESAGA No. 122060）直接在凝胶表面上测定 pH 梯度。最好用手工操作，以便保证在各 pH 部位上有足够的时间测得稳定值，有一种半自动化的 pH 梯度测定装置商品（图 3；参考文献 [6]）（Hoefer Scientific），但使用时必须注意下列几点:

(i) 装置中的 Ingold 接触电极的反应时间缓慢，每扫描长 4.5cm 凝胶最少需要 9 分

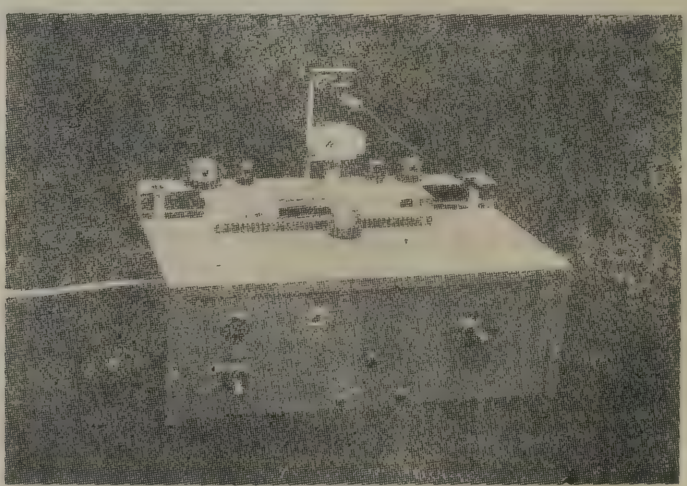


图 3　聚焦电泳柱胶的 pH 梯度测定装置。将凝胶放置在小匣（第 2 部分）中。一支接触复合 pH 电极（Ingold 电极 Inc.）安装于电极插座 11 上。当小匣移动通过静止的电极时，凝胶上的 pH 梯度即被自动记录下来。扫描速度应小于 0.5cm/min。其它部分的细则和说明参见文献 [6]。

钟(目前 Hoefer 仪扫描快得多)，而用旧电极或在电极的膜表面上附着有聚丙烯酰胺或蛋白质的电极，所需要的时间更长。因此每次使用后应清洗接触电极。Ingold 仪器厂提供的含 NaOCl 的清洗液并不总是有效的。事实上证明，单一的清洗手段(如擦洗，3mol/L KCl，1*N*HCl) 不能有效地延长电极的使用寿命。

(ii) 在梯度的起始及结束处,同样也由于电极反应迟缓,用测量装置测得的 pH 值可能不准确。为了解决这一问题,扫描前电极应放置在凝胶的一端上,并令其平衡。扫描结束时,电极应放置在凝胶的另一端,直至 pH 读数稳定。

(iii) 若与 pH 有关的凝胶膨胀引起凝胶的直径有明显的改变时，应用手调整电极的高度,使接触电极处在凝胶表面的槽中。

至今,仪器应用的结果表明，该仪器节省劳力并可用于 pH 近似值的测定，精确度为 pH 单位的十分之几。若需进行精确的测定,则应该运用手工的测定值来校正用自动扫描所得的结果。

与 pH 梯度的测定不同,沿 pH 梯度测定蛋白质活性的图形需要一种专门的仪器，即能够重复将凝胶连续切成厚 1mm 薄片的横向切片器。聚焦电泳的凝胶比大多数凝胶更难切片(见第 1 章和第 2 章),因为聚焦电泳需要应用以 5%T、15% C_{DATD} 类型为代表的有弹性的开孔胶 (见下文和参考文献 [7])。目前,尚缺乏可将凝胶切成薄片而误差极小的横向切片器商品供应[8,9],但是最近二种市售改良的振动金属丝切片器 (vibrating wire slicer) (Hoefer仪器厂或 Bio-Rad Laboratories Ltd.) 有可能使操作者将 6%T 切出重复性良好的切片,更细心时甚至对 5%T、15% C_{DATD} 胶也能切出重复性良好的切片：操作者可用一只变阻器降低切割丝的振动频率，同时将凝胶放置在有栅格的槽中，有槽的栅格可以容许金属丝穿过凝胶所在的平面，因而能保证凝胶完全截断[5]。我们也发现数毫米厚 0.5×10cm 床积的 1—2%琼脂糖,能有效地代替有栅格的小槽。

凝　　胶

同等速电泳一样(第 3 章),聚焦电泳需要“非排阻性的”、抗对流的凝胶。基于三种理由,选择合适的凝胶比等速电泳更严格。

(i) 当蛋白质接近 pI 时泳动速度减慢；因此分子筛效应不仅阻滞蛋白质的移动，而且能使它们完全停顿下来,形成虚假的 pI。

(ii) 由于凝胶在 pH 梯度各区域的膨胀程度不同,因此粘壁问题更为严重。

(iii) 为了能在尽可能短的时间内从凝胶上溶解和提取处于稳定状态下的等电点沉淀,要求凝胶具有最大的孔径。

聚丙烯酰胺凝胶

满足上述三种互不协调的要求最恰当的溶液是 5%T、15% C_{DATD} 胶[7],或者是为了确定蛋白质的活性部位，需对作切片的凝胶作确切的定位，可应用具有同一交联度的 6%T 胶。这类凝胶比现有的各类凝胶具有更好的弹性和粘壁性质。正如第 3 章图 1 所示,这类凝胶并非象人们所希望的那样是“非排阻性”凝胶；6% T 凝胶能阻滞分子量超过 100,000 的分子,而 5% T 凝胶则能排阻分子量超过 500,000 的分子。然而,用于评价“非

排阻性”的浓缩标准 [pH10.5，RM(1,9) = 0.064；见第 2 章] 对聚焦电泳来说是不够严格的。如上所述，当接近 pI 时，随着泳动速度的下降，阻滞作用表现得更明显，而在等速电泳中，当泳动速度恒定时，阻滞作用则保持不变。

利用前面介绍的阳极和阴极电极液可互换的柱电泳仪，能够方便地试验粘壁效应；若粘壁不合适，则 pH 梯度朝浸泡凝胶的较低的电解液 pH 方向变化[2]。

Sephadex 凝胶

若聚丙烯酰胺损害蛋白质的活性或待分离的蛋白质分子很大，聚焦电泳可在 Sephadex G-75 (Ultrodex, LKB) 凝胶管中进行。将 Sephadex 装入玻璃管中，两端用聚丙烯酰胺凝胶填充(参考文献 [10] 及 An der Lan, B., Allenmark, S., Fitze, P. 和 Jackiw, A., 待发表)。但是与聚丙烯酰胺凝胶比较，它有某些缺点，不宜于用常规方法将凝胶切片。目前，这类凝胶必须在冰冻并从凝胶管中挤出之后，置于冷盘中手工切片。也可以使用一种自动闸刀样凝胶切片器 (如 Joyce-Loebl Ltd. 的 Mickle 凝胶切片器)，但使用时必须用致冷剂而不能用固体 CO_2，因为凝胶吸入 CO_2 气体后将改变切片的 pH。

琼脂糖凝胶

尽管琼脂糖已大量应用于水平板聚焦电泳，同时至少在某些缓冲系统中(第 3 章)也应用于等速电泳，但应用于柱聚焦电泳目前还存在着某些问题，即便是在胶化前涂琼脂糖于管壁上以增强粘壁效应时也是如此。在 10—20V/cm 聚焦电泳数小时后，粘壁作用开始降低，最终至凝胶从管中脱出。用不含明显带电 (硫酸基) 基团的琼脂糖 (“IsoGel”, Marine Colloids Div. FMC Corporation)，也观察到相同的现象，它表明这一问题不是由于电荷作用。聚焦电泳中琼脂糖的物理不稳定性的另一可能原因是凝胶随 pH 的变化而膨胀和(或)皱缩。

另一问题是琼脂糖凝胶上形成的 pH 梯度不如聚丙烯酰胺稳定，尤其是在较高 %T 条件下所形成的 pH 梯度。梯度的稳定性欠佳可能与琼脂糖的孔径较大有关。此外，推测 pH 梯度形成的等速电泳性质[15] 可能是这种相对不稳定的原因。某些以琼脂糖作基质的缓冲系统(第 3 章)不能浓缩蛋白质的事实支持了这一设想。

pH 梯度的形成

最初，聚焦电泳的研究是利用合成的两性电解质载体产生的 pH 梯度来进行的。常见的具有不同 pK 值的缓冲剂的混合物能产生自然 pH 梯度的事实，为寻求最佳分离效果极大地扩大了选择 pH 梯度的随意性[5]。有几种措施可供选用:

(i) 用“缓冲剂聚焦电泳”能制备包含待分离物质狭窄的 pI 在内的水平 pH 梯度。

(ii) 通过选择具有合适 pH 值的电解质，能够将 pI 值超出所需 pH 范围之外的载体组分置换到阳极或阴极电解质中，即“组分替代”[12]。

(iii) 调节阳极电解液的 pH 值可改变 pH 梯度[13]。

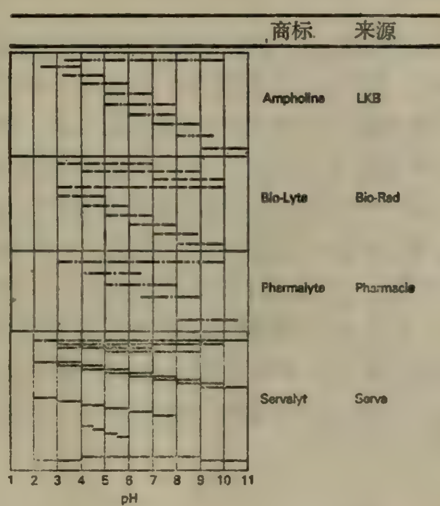
“Ampholine” 与缓冲液

聚焦电泳分级分离开始时，有益的做法总是选择 pH 梯度范围较宽的 Ampholine，以

避免对蛋白质种类或其表观 pI 值（pI'）进行推测。用适当的人工合成的两性电解质混合物，统称 Ampholine，易于制备陡峭的 pH 梯度。 这类物质有商品供应（pI 范围 2—11 Servalyt，3—10 Pharmalyte 或 Bio-Lyte，或 3.5—10 LKB Ampholine；见表 1），也可以在实验室中合成[14]。由于 pH 梯度很陡，所以蛋白质泳动速度保持相当高，直至抵达其等电点位置附近。但是，这种范围广的 pH 梯度极难稳定。它们主要的作用是确定所需 pH 的范围。 正如所预计的那样，其分离效果不及较平坦的 pH 梯度所获得的结果[5,11]。采用 pI 范围较窄的 Ampholine（表 1）或将合适的缓冲剂相混合[11]，能制备其 pH 范围接近于有关蛋白质 pI 值的平坦 pH 梯度。 表 2 列举了某些可选择已证实适于制备聚焦电泳 pH 梯度的缓冲剂。此外，通过选择对贮液槽电解质合适 pH 的载体组分即"组分替代"，也能制备平坦的 pH 梯度[12]。

表 1　商品性载体两性电解质的 pI 范围

	商品名称	供应厂家



目前，由于人们对 pH 梯度形成机理的了解仍不足以从载体组成、阳极和阴极电解质的 pK 值来推测 pH 梯度，因此，pH 梯度的制备除了根据经验以外，不得不系统地进行。同样地是 pK 值适用的缓冲剂在数量上和化学性质上极为受限，尤其是当人们选用 pH 梯度比非两性电解质(设想其 pK 值与两性电解质的 pI 值接近)更稳定的两性电解质时更是如此。况且，在估算数种缓冲剂的组成时所付出的劳动，也是设计缓冲剂 pH 梯度时的一个极大的限制。 用目前的知识只能通过改善载体缓冲剂混合物的组成来改变 pH 梯度的某些性质：即加酸则使 pH 梯度更酸，加碱则使 pH 梯度更碱[11]。pH 梯度朝更高方向改变的另一方法是利用具有较高 pK 值的阳极电解液，直至阳极电解液的 pH 接近聚焦电泳凝胶阳极末端的 pH 值[13]。进一步增加阳极电解液的 pH，将导致凝胶中的载体组分置换到阳极电解液中[12]。

两性或非两性载体组分

形成自然 pH 梯度的速率与载体组成是否是两性的、非两性的或者是二者的混合物

无关；换言之，pH 梯度可能通过一种非等电的机理方式形成1)。实际的问题是为了获得一种合乎要求的 pH 梯度究竟选取哪种载体组分。等速电泳或聚焦电泳的理论均未涉及这一问题。从聚焦电泳的经典理论知道[17]，pH 梯度仅与两性电解质载体组分有关，良好的组分在其泳动率为零（即 pI）时，应提供最大的导电性。只有当载体组分上的酸与碱性功能基的 p*K* 值在数值上十分接近时才能满足这种条件。要求两性电解质载体组分具有数值相近的 p*K* 值的这一限制，实际上完全排除了所有可供应用的酸、碱 p*K* 值相差较大的两性电解质缓冲剂。非两性电解质缓冲剂在距离其 p*K* 数值为 2 个 pH 单位的范围时，其泳动率为零，此时的导电性极差，同时也丧失其缓冲能力。

尽管如此，确能用各种形式的载体组分形成梯度，处于泳动率为零的状态下，即导电性和缓冲容量最小的非两性电解质缓冲剂通过其本身[6,15,18]或与两性缓冲剂，甚至其 p*K* 值与两性缓冲剂的 pI 值数值相差甚大者相混合[11]，可产生有应用价值的 pH 梯度。

平坦的和陡峭的 pH 梯度

若阳极电解液和阴极电解液的 pH 数值与凝胶末端的 pH 数值相接近，梯度的 pH 范围越窄，则梯度似乎越稳定。同样，pH 范围越接近中性，pH 梯度也越稳定，至少当人们利用终端载体组分作阳极和阴极的电解质时的情况是如此。然而从分离的观点来看，至今尚不了解梯度平坦到何种程度较为适宜。我们早先的“越平坦越好”的观点看来是有问题的，因为在其 pI 值附近具有平坦滴定曲线的蛋白质似乎不能以适当的速度进入凝胶。不足为奇的是，区带宽度随 pH 梯度趋向平坦而增加；结果分辨力降低以致几乎完全抵销了分离过程中的改进[5,11,19]。与平坦 pH 梯度有关的另一问题是由于蛋白质迁移速度降低，其聚焦时间明显延长。于是在“中等程度陡峭”的 pH 梯度中，如目前含 2 个 pH 单位范围的两性电解质载体商品（表 1），进行分级分离似乎是一种满意的折衷方法。这也是目前应用的两性电解质缓冲剂所能达到的缓冲聚焦的 pH 范围（见表 2）。

pH 梯度的直线性

常根据载体提供线性梯度的能力来选择载体组分。然而，线性化对聚焦电泳的有效分离并非必须。重要的是其 pH 梯度在待分离蛋白质等电区域中应适度平坦。pH 梯度的直线性取决于所选取的载体组分种类。仅用 8—10 种缓冲剂已制备出有用的，包含 2—3 个 pH 单位的非线性 pH 梯度[15,18]。

高离子强度下电聚焦

若蛋白质需要高离子强度以保持其稳定性和活性，可加盐至各相中以增加离子强度[20]。这必然引起电热效应的增强。此效应只能通过采用极低的电压来克服，并通过延长电泳时间予以补偿。可替代加盐效果的另一种方法是在高浓度载体组分中进行聚焦电

1）这一观点的间接证据是，通过当泳动率为零时先导成分处于静止状态下的等速电泳机理[15]可以产生 pH 梯度。若这一观点正确，由于各组分均处于远离具 pI 值的 pH 条件下，即均带有电荷，因此，将按照组分泳动率的顺序排列，在组分泳动的整个轨迹上产生导电性。基于这一假说，为了从组分的 p*K* 值推算出 pH 梯度，人们应当计算出稳态顺序移动界面及各相有效的 pH 值[16]。为达到这一目的在所需要的计算程序编制出来之前，人们除了根据经验系统地改变组分以获得所希望的 pH 梯度之外，别无它法。

表 2 形成自然 pH 梯度混合物的缓冲剂

组　　成	pI	pK	pI − pK
MES	3.07*	6.15	3.08
ACES	3.45*	6.90	3.45
BES	3.57*	7.15	3.58
MOPS	3.60*	7.20	3.60
TES	3.75*	7.50	3.75
HEPES	3.77*	7.55	3.77
乳酸		3.80	
EPPS	4.00*	8.00	4.00
醋酸		4.75	
TAPS	4.20*	8.40	4.20
丙酸		4.87	
N-三(羟甲基)甘氨酸 (tricine)	5.07*	8.15	3.08
N-二(羟乙基)甘氨酸	5.17*	8.35	
甘氨酰-甘氨酸	5.20*	8.40	
吡啶		5.25	
天冬酰胺	5.40*	8.85	3.45
苏氨酸	5.59	9.18	3.59
丝氨酸	5.68	9.15	3.47
羟脯氨酸	5.82	9.73	3.91
异亮氨酸	6.04	9.76	3.72
甘氨酸	6.06	9.78	3.72
Bistris		6.80*	
Bistrispropane		6.80*	
β-丙氨酸	6.90	10.20	3.30
咪唑 (imidazole)		6.95*	
γ-氨基丁酸 (GABA)	7.50	11.30	3.80
GACA	7.60	10.75	3.15
三乙醇胺		8.35	
AEPD		8.80	
腺苷酸		8.80	
氨		9.25	
赖氨酸	9.47	10.53	1.06
丁醇胺		9.50	
三乙胺		11.01**	

1. 资料来自：a) Calbiochem 目录；b) 理化手册；c) Merck 索引。
2. 除 * 为 20℃；** 为 18℃外，其余的 pK 值及 pI 值均为 25℃下数值。
3. 磺酸类缓冲剂的各个 pI 值按 pI = pK/2 计算，即 pK (R-SO_3H) = 0.00。
4. 溶解度不大的化合物(如谷氨酸和组氨酸)或 pI − pK 数值大于 4 (如牛磺酸)的化合物不包括在表内。

泳。但是，即使是浓度在 0.1 至 1.0mol/L 的条件下，pH 梯度中的任何点上的导电性，也就是离子强度仍然很低。尽管如此，在这一条件下仍然有可能保持蛋白质的天然性质。为保持蛋白质的天然性质，Ampholine (表 1) 的最终浓度可高达 20%，其它可溶性缓冲剂的浓度则可在 mol 水平的范围(表 2)。

载体组分在整个 pH 梯度中的分布呈非连续状态。聚焦电泳一段时间后，通常在中

性部位（见下文）出现电压峰。曾试图向载体组分中加入 p*K* 值差别很大的两性化合物，如三甲胺基丙烷-磺酸盐（trimethylamino-propane-sulfonate），以消除这类“电导间隙”（conductance gaps）[21]。然而，即使这类化合物浓度大于 1mol/L，也不能消除“电导间隙”，无疑，这正是因为它们不能导电所致。

另一种使聚焦电泳凝胶更易导电或导电更均匀的方法，是将 p*K* 值差别很大的“不良载体两性电解质”，例如多种氨基酸，加于体系中。尽管干扰了稳定状态因而可能对分离作用产生不利影响，但它们能暂时地提高电导性。

去污剂存在下的聚焦电泳

若人们乐意等待，离子型去污剂对于 pH 梯度的形成是适宜的。如前所述，在加入离子型去污剂后导电性增加迫使人们降低电压，以便不超过仪器的散热能力，尽管利用一个电冷却装置十分有效的聚焦电泳仪能改变这种情况。相反，非离子型的和两性去污剂却与聚焦电泳方法极为协调。它们不引起 pH 梯度[22]或电导性出现任何明显的变化，尽管它们能抑制蛋白质和载体两性电解质之间的相互作用[23]。烷基-磺三甲铵乙内酯型（alkyl-sulfobetaine）的两性去污剂（如 Calbiochem-Behring 的 Zwittergent 3—14）已有商品供应。曾报道具有刚性碳氢骨架的类似去污剂，在适当条件下不会使蛋白质变性[24]。

阳极和阴极电解液的选择

经典聚焦电泳应用的是强酸性阳极电解液和强碱性阴极电解液。其基本原理是，当载体组分迁移到凝胶的末端并与强酸或强碱接触时，将发生质子化或去质子化，因而改变它们的泳动方向，并保留在凝胶中。但是，若人们采用 pH 梯度的末端载体两性电解质作阳极电解液和阴极电解液，同样也可以产生 pH 梯度，在这种情况下，还具有另一优点，即 pH 梯度的稳定性随时间的增加而增强[25-27]。重要的是应避免平衡离子的存在，它们可能携带过量的电流通过 pH 梯度凝胶而引起发热。因此，若末端组分为两性电解质，则应选择等电形式。同样，若末端组分为非两性的，则应当选取完全质子化的酸或完全去质子化的碱，且距 p*K* 值为二个或二个以上 pH 单位。在缓冲剂聚焦电泳中，“末端”组分易于识别；它仅仅是在载体组成的混合物中具有最高或最低的 p*K* 值或 pI 值的成分。若用“Ampholine”产生 pH 梯度，则将阳极和阴极电解质最终浓度为 0.02—0.03mol/L，并使混合液中载体两性电解质为 1—2%。混合物中 pI 值超过阴极电解液 pH 或低于阳极电解液 pH 的各载体组分将迁移到电解液槽中（“组分替代”，参考文献 [12]），而将阳极电解质和阴极电解质作为凝胶的末端组分保留在凝胶的末端。

显然，通过选择阳极电解质及载体组分[13]，可以在一定范围内调节 pH 梯度，尽管实际上阳极末端的工作 pH 并不与选定的阳极电解液的 pH 值相同。例如，利用 pI 范围为 4—8 的 Ampholine 和 pH 3.3（p*K* 6.21）的二甲胂酸（cacodylic acid）作阳极电解液，形成阳极末端为 pH 5 的 pH 梯度。在相同的系统中，若采用 pH 为 2.8（p*K* 5.12）的二甲基丙烯酸作阳极电解质，则末端 pH 为 4[13]。尚缺乏简便易行的方法来预测为获得所需要的阳极及阴极末端的工作 pH。因此可能需要系统地改变不带电荷形式的阳极电解质，即距其 p*K* 值 2 个或 2 个以上 pH 单位或在其 pI 值处，直至选取的 pH 产生所需要的末端工作

pH 值[13]。此外，通过系统地组分替代也能达到这一目的。

阳极电解液和阴极电解液的浓度越高，其 pH 梯度越稳定[25]。考虑到溶解度及经费因素，通常采用 0.1mol/L 溶液。由于可供应用的等电的阳极电解液/阴极电解液及完全质子化或去质子化的酸和碱的缓冲容量低，为了维持电泳槽中的 pH 不变，需要采用大的阳极电解液槽和阴极电解液槽。所推荐的凝胶柱电泳仪的贮液槽容量可达 500ml 或更大，但是相当数量的水平板电泳仪缺乏这种大容量的贮液槽。由于电解反应甚至在大贮液槽中也容易引起 pH 改变，因此电泳时应定期检查 pH 值，若 pH 或导电性发生明显改变，应更换电解液溶液。于是，与利用强酸和强碱作阳极电解液和阴极电解液相比较，用末端组分作阳极电解液和阴极电解液时具有某些实际困难及耗费问题。但是，由于需要保持梯度稳定，特别是平滑的 pH 梯度的稳定，以确保蛋白质到达其分离作用可以重现的等电终点，用末端组分作阳极和阴极的电解液是合适的。

聚焦电泳的动力学

pH 梯度

最初，人们认为聚焦电泳产生一种“平衡状态”，首先是载体组分的平衡状态产生一稳定的 pH 梯度，随后是蛋白质在各自的等电位置达到平衡。人们普遍支持的观点是，蛋白质的分级分离是在稳定状态下，即在梯度开始衰变之前发生，这一见解基于观察到蛋白质图谱相当迅速地形成的事实。然而，这些图谱不可能是恒定的，因为它们未必能反映出各自的等电位置。实际上，人们能够限定载体组分和蛋白质的稳定状态仅与特定的伏特-时间因素有关；即 pH 梯度的形成和衰变（以及蛋白质达到其等电位置）为所加电压和电泳时间的函数。例如，在 20—40V/cm 胶条件下，通过将载体组分按 pI 的顺序或组分的泳动率排列起来，在数小时内即形成自然 pH 梯度；可以认为这种排列为一种“稳定状态”。然而，在凝胶等电聚焦的大多数状况下，pH 梯度似乎是在不断地运动，以致在 pH 梯度的形成和衰变中建立的“稳定状态”事实上是暂时的。

载体组分分布上的改变部分地与此有关，并阐明了 pH 梯度的动力学问题（参考文献[28]和图 4）。例如，在阳极为强酸性、阴极为强碱性电解液的条件下，在 pI 为 3.5—10 的 Ampholine 系统中，载体两性电解质首先从 pH 梯度的中性中心区逐渐消失，并在一条酸性和碱性峰中积聚。随后，碱性、中性和酸性组分相继地泳动至阴极电解液贮液槽中，而酸逐渐从阳极电解液贮液槽中移出，直至 pH 梯度破坏和凝胶酸化。与载体组分移动有关的 pH 梯度自身则在典型条件下聚焦电泳数小时内达到所谓的“稳定态”，即具有最大跨度（span），在经历通常的“阴极漂移”（cathodic drift）过程中，pH 梯度逐渐变平坦和扭曲。选择一种与阳极酸性电解液相比较为强碱的阴极电解液，也能引起相反的“阳极漂移”（anodic drift）[2]。因此，通常没有真正而又持久的 pH 梯度可以确认。在弱酸性的阳极电解液和弱碱性的阴极电解液之间建立的窄范围的 pH 梯度，能稳定数天[11,26,27]，可能是由于处于暂时状态的某些载体组分对系统的电导作用的结果（基本的设想是不均一的导电引起 pH 梯度的破坏）。在 pH 梯度破坏的条件下，也不存在蛋白质分布的稳态。然而，在 pH 梯度破坏的电压-时间因素系统内，蛋白质的确能逐渐接近一恒定的 pH。因此，对蛋白质而言，人们能够根据 pH 确认其稳定状态，尽管在梯度中的这一 pH 位置是在

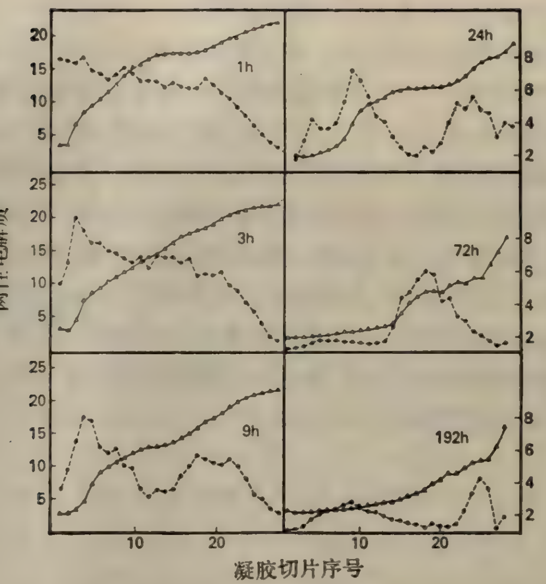


图 4　聚焦电泳过程中 pH 梯度形成的动力学。将含 ^{14}C-Ampholine 的聚焦电泳凝胶电泳 1—192h，并分析 pH 梯度及 ^{14}C-Ampholine 的分布(摘自参考文献 [28])。

变化着。

由于蛋白质向其等电 pH 部位泳动缓慢(见下文)，因此 pH 梯度的不稳定性在聚焦电泳的实践中是重要的。而且由于二种原因，蛋白质必须“到达”或极为接近其等电位置：

(i) 若人们在暂时状态期间完成分离工作，即在混合物中的各蛋白质逐渐接近其 pI 区域的渐近相 (asymptotic phase) 之前，即在“图型恒定” (pattem constancy) 之前完成分离工作，则与通常实验中所得到的结果比较，蛋白质相对位置的重现性主要决定于各次实验之间电压梯度和凝胶浓度的一致性。由于相同的原因，分辨率很少能重复。

(ii) 根据 pH 来确定蛋白质的特征将变得无意义并且更具随意性，除非 pH 值至少与 pI' 值大致相等。

分别或合并应用下列方法以稳定 pH 梯度：

(i) 将 pH 范围变窄，至多为包含待分离物质 pI 在内的 2—3 个 pH 单位。通过选择缓冲剂的聚焦电泳中的载体组分[11]，或在组分替代中令阳极电解液的 pH 值高于阳极末端选定的 pH 值，令阴极电解液的 pH 值低于阴极末端选定的 pH 值[12]，都能获得狭窄的 pH 范围。此外，也可以通过减少阳极末端和不带电荷的阳极电解质(例如完全质子化的酸；见参考文献 [13]) 之间的 pH 差使 pH 范围变窄。

(ii) 令阳极末端组分的 pH 与阳极电解液 pH 相同，并令阴极末端组分的 pH 与阴极电解液 pH 相同[25]。

(iii) 在溶解度和价格许可的条件下，可以将阳极和阴极电解液的浓度尽可能地增高[25]。通常应用 0.1mol/L 溶液。

(iv) 经充分清洗、涂胶、机械支持及流体静力学平衡，使凝胶具有粘壁的性质。粘壁性质的改善总是使梯度更稳定，用反转极性(阳极首先在顶端，然后在底部)并证实对 pH 梯度无任何影响的方法来检查粘壁作用的改善[2]。

(v) 可以增加载体两性电解质的浓度。

(vi) 可以增加粘度。但是，增加粘度似乎只在某些场合中有效（实例见参考文献[29]），而在其它场合中无作用（实例见参考文献[28]），其原因尚不明了。

蛋白质

蛋白质在 pH 梯度中朝其等电部位泳动的速度通常缓慢（图 5）。其泳动速度受蛋白质滴定曲线控制。而且，随着蛋白质在 pH 梯度中接近其等电位置，泳动速度不断降低。泳动速度缓慢部分是由于凝胶的分子筛作用，这不仅是在有明显限制性孔径的凝胶中是如此，甚至在实验中已表明为非限制性的凝胶也是如此[7]，由于低的泳动速度对凝胶基质中任何微小的阻滞效应更敏感，在接近 pI 的过程中，凝胶逐渐变成更具有阻滞性。

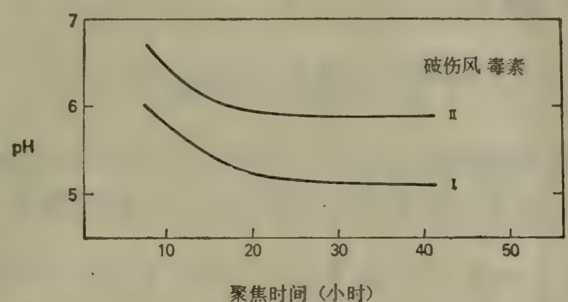


图 5　聚焦电泳时间对蛋白质表观等电点的影响。破伤风毒素在 Ampholine（pH 3.5—10）聚丙烯酰胺凝胶（6%T，15%C_{DATD}）中，经不同时间的聚焦电泳，然后分别测定破伤风毒素的表观 pI（摘自参考文献[5]）。

为了在理想的分辨率的条件下获得可重现的分离效果，必须通过实验测定泳动到一恒定 pH 部位中所需要的聚焦电泳时间。若 pH 保持恒定的时间比达到这一 pH 所需要的时间长二倍以上，则这一 pH 值定义为某一蛋白质在特定的载体组成，离子强度和温度条件下该蛋白质特征的表观 pI(pI')。只有这种 pH 值可以作为鉴别蛋白质的物理常数。由于缺少蛋白质泳动到一恒定 pH 的依据，使至今在凝胶聚焦电泳研究中已报道的大多数"pI"值无意义。因此，对每一种分离而言，首先必须在实验中测定待分离蛋白质达到恒定 pH 值所需要的时间。然后，人们应按前述方法在确定的（最大）电压下，设法使 pH 在需要的时间内稳定下来。

当蛋白质在凝胶上逐渐接近其 pI' 部位时，由于区带中的浓度相当高，结果常常发生蛋白质等电沉淀。这种沉淀在分析性操作中危害较小是由于蛋白质沉淀带仍然能泳动，推测可能是通过再溶解和再沉淀的过程来实现，尽管它可能是蛋白质在接近其 pI 区域时的另一阻滞因素。与此相反，在制备性规模的聚焦电泳中，蛋白质沉淀确实表现出有重要影响。区带中的蛋白质等电沉淀的时间越长，从区带上溶解蛋白质就变得越来越困难。或许是由于相同的原因，当聚焦电泳的时间大大超过达到 pI 值的时间时，随着聚焦电泳时间的增加，蛋白质活性的回收率似乎也降低[30]。

导电性

聚焦电泳中的另一个动力学因素，于凝胶内在最大电压下电泳一段时间后，常在

pH6 左右出现。导电性在 pH 梯度中呈不均匀分布，即开始时 pH 梯度末端的电压最大，然后逐渐变化到中性的中央部位电压最大，这一事实直到最近建立了一种量度导电性的方法以后才为人们所认识[3,4]。这一现象在目前所考察过的各种两性电解质载体所形成的 pH 梯度中，以及在仅用赖氨酸(阳极电压最高)、谷氨酸(阴极电压最高)所形成的 pH 梯度中，甚至在载体组分完全不明确的凝胶(中性部位电压最高)中均观察到[3,4]。这些资料表明，电压最大区(电导间隙)是在载体组分已迁出的 pH 梯度区内形成。

局部电压最大则凝胶的其余部分电压降低，并降低泳动率。较为缓慢的泳动能阻止蛋白质到达其等电部位，并产生一pH 恒定的坪台值的假象，即形成虚假的 pI' 值。这一问题可以通过在凝胶两端加样品后，测定其 pI' 值来检查。除了向各相中加入 0.1mol/L KCl 使分离进行异常缓慢外，至今无其它的补救方法[20]。试图添加两性电解质使电导空隙中导电，但至今未获得成功。

分析性凝胶聚焦电泳程序

凝胶聚焦电泳的简略程序早已报道[31]。程序中许多步骤与 PAGE 和等速电泳相同(见第 2，3 章)，但为了阅读方便，其中某些部分在本节中再略加复述。

步骤 1：仪器

用长 12cm (内径 0.6cm，外径 0.8cm) 的硬质玻璃凝胶管，管的二端在火焰上略烧光滑。凝胶管用甲醇性 KOH 清洗，再冲洗至中性，并用 1% Gelamide 250 (Polysciences 或 Union Carbide) 充满玻璃管，再用滤纸吸干来涂布玻管[2]。室温下放置数天干燥后，随即将玻璃管贮于无尘处待用。准备一块 (2 × 2cm) 的尼龙网 (88μm, Small Parts Inc.) 和内径为 0.7cm、长 2mm 的氯乙烯和酸乙烯共聚物 (Tygon) 管，以便在聚合后作凝胶的机械支持物。

柱电泳仪与 PAGE 和等速电泳中所应用的仪器相同(见第 2 章图 1)，并按图 1 所示制作。若需要监测或控制凝胶的电压，同时每一玻璃管中凝胶组分相同，则按图 2 所示，将上、下监测电极安装在上缓冲液贮液槽中。用蜡膜 (Parafilm) 将凝胶管一端封死，并取必要数量的凝胶管安装在上缓冲液贮液槽中，通过橡胶垫圈和导孔使凝胶管保持垂直状态，多余的橡胶垫圈则用橡皮塞堵住。再将上缓冲液贮液槽置于下缓冲液贮液槽之上。

由于聚合作用应当在与聚焦电泳相同的温度下进行，所以聚合前下缓冲液贮液槽应充满电解液(见步骤 3)。利用流速为 1.5—3.5L/min 的冷却剂，并持续搅动下槽的缓冲液，将仪器温度经常维持在 0—4℃。

步骤 2A：聚丙烯酰胺凝胶的聚合

一般常采用 5% 或 6%T、15% C_{DATD} 浓度的凝胶[7]；第 3 章的图 1 提供了一种粗略估计这类凝胶对大小不同的各种蛋白质分子的排阻范围。应当用浓度最高又无排阻效应的凝胶，因为这类凝胶的机械稳定性和粘壁性最好。应当注意的是，图 1 (第 3 章)中的“无排阻效应”的标准对聚焦电泳来说(参看前述讨论)是不够严谨的。某些实验者继续使用双丙烯酰胺交联的凝胶 (见第 5 章)，虽然这类凝胶比 DATD 交联凝胶的排阻作用更

强。

在 25ml 琥珀色的瓶中制备聚合混合物，瓶中置一小磁力搅拌棒并与仪器温度平衡。将丙烯酰胺-DATD 贮备液，两性电解质或缓冲剂的混合物与起动剂贮备液按正确的比例(表 3) 相混合。凝胶混合物用真空泵脱气 5 分钟。为了能重复脱气过程，可利用一定制的真空抽气机。脱气后加入 TEMED (每 10ml 凝胶混合物加 5μl)，每管注入 1.6ml 凝胶混合物，然后细心地用一支装有 23 号针头的 1ml 注射器在凝胶上部盖上厚 2mm 的水层。也可以用一支 100μl 的 Hamilton 注射器。在这两种情况下，必须十分小心不得搅动凝胶的表面。用荧光灯照射凝胶 30 分钟，使凝胶发生光聚合作用。为了使聚合作用均一，应按前述方法那样使用一组荧光灯。

表 3　聚焦电泳中聚丙烯酰胺凝胶的制备

在一次典型的应用中，0—4℃下按下述方法制备 10ml 用于聚焦电泳的聚合混合物:
5ml　10%T，15% C_{DATD} (8.5g 丙烯酰胺+1.5 g DATD/100ml)
2.5ml　4% "Ampholine" (或 2.5ml 缓冲剂混合物，每一组分均为 0.4mol/L)
2.5ml　0.06%过硫酸钾，0.002%核黄素。
混合后，0℃下将聚合混合物真空 (1333.2Pa) 脱气 5 分钟，然后加入 5μl TEMED 以起动聚合反应。聚合时间为 30 分钟。

碱性(胺)载体组分可能以 TEMED 的方式催化交联聚丙烯酰胺的聚合作用，其结果是聚合速度过于迅速，产生平均链长短和机械稳定性不佳的凝胶。为了避免这一缺点，在采用碱性载体组分时，为了使聚合作用大约在 10 分钟以内完成，应当将三种聚合起动剂的浓度降低。实际上，保持二种聚合起动剂浓度恒定，并系统地降低第三种起动剂浓度，极易达到这一速度。在高 pH 条件下发生过度催化时，系统地降低过硫酸钾的浓度，是使过高的聚合速度降低的最为有效的方法[1,31]。

步骤 2B：柱形 Sephadex 凝胶的制备[10]

将 0.2g Sephadex G-75 (Ultrodex, LKB)，或根据蛋白质分子的大小选择的其它凝胶过滤基质，与约 5ml 载体两性电解质或所需要的 pH 范围和浓度的缓冲剂混合物相混合并制成浆状物，再根据产品说明书让凝胶膨胀数小时，以备每一凝胶管应用。制作的硬质玻璃管至少长 20cm (内径 0.6cm，外径 0.8cm)，管的一端在火焰上烧光滑以防损伤橡胶垫圈。将玻璃管插入一塑料滤器的支架上，支架上装有直径为 1cm 的尼龙网 (100μ) 滤膜，滤膜紧贴在玻璃管的底部(图 6B)。将组合物置于真空室上(图 6A)。每一玻璃管用搅动的凝胶悬浮液充满，注意避免混入气泡，在真空状态下令凝胶压实。长的玻璃管容许将全部凝胶浆一次加入。玻璃管一旦用凝胶填实，应立即撤去真空，同时在 Sephadex 柱的上端聚合 0.5ml 含有阳极电解液或阴极电解液的丙烯酰胺溶液 (6—10%T，2% C_{Bis}) 使其密封。待聚丙烯酰胺凝胶塞形成后，将玻璃管倒置并从上端取出约 0.5ml Sephadex，再用含有另一种电极电解液的丙烯酰胺在管内聚合一个类似的凝胶塞。聚合混合液中可加染料以标志出相应的凝胶塞。如果需要，可截去玻璃管过长的部分，这样可以防止在凝胶管中凝胶以上出现大的电压降[32]，可能是由于在"阴极漂移"的过程中，从凝胶中移出的等电组分取代了电极电解液的缘故[28]。若玻璃管用蜡膜密封，至少可在冰箱中贮存一周。

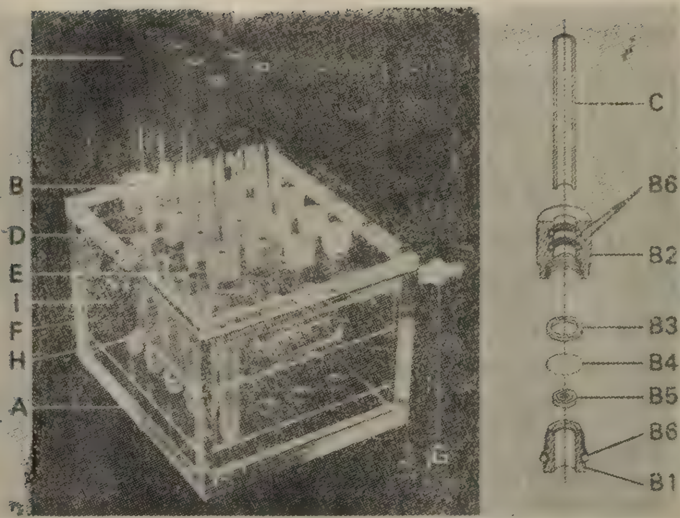


图 6 聚焦电泳中用来装填柱状 Sephadex 凝胶的真空室（An der Lan, B., Allenmark, S., Sullivan, J., Fitze, P. 和 Jackiw, A., 正在制作)。有机玻璃盒 (A) 中有一个能装 20 支 Sephadex 凝胶管的装置 (B)，可以同时装 20 支内径为 0.6cm 的硬质玻璃管 (C)，装有托套的小孔 (D) 用来将液体收集到一个乳头状接口的引流管，再流入试管 (E)，试管置于试管架 (F) 上。经接头 (G) 将小室抽真空。用硅橡胶垫圈 (H) (图上不能见到) 和一个弹簧夹 (I) 将小室密封。过滤托套装置 (B) 的部件分解图见右图。它由一个改进的 Millipore 滤膜托套 (B1) 和一块托有一张直径 1cm 的尼龙网 (100μ) 滤膜 (B4) 的隔膜 (B5) 组成。通过一个具有小突边的塑料 (Lexan) 管托套(B2) 和一个聚四氟乙烯垫圈 (B3)，将直径 0.8cm 的玻璃管 (C) 固定在尼龙网上。用装在凝胶管托套中的二只O型垫圈及滤膜托套中的一只O型垫圈 (B6) 密封。

步骤 3：聚焦电泳仪的组装

聚丙烯酰胺凝胶一旦制成，即将上缓冲液贮液槽取出并倒置。用滤纸轻轻地吸去覆盖在凝胶上的水层，用刀片刮去每支玻璃管一端上的蜡膜，再放上一块尼龙网 (2 × 2cm, 88μ, Small Parts Inc.)，并用一截长 2mm、内径 0.7cm 的 Tygon 管固定。必须细心操作，在凝胶和尼龙网之间不得混有气泡。若蛋白质样品为阴离子的，则下层缓冲液贮液槽中注入阳极电解液，若蛋白质是阳离子的，则注入阴极电解液，然后上缓冲液贮液槽以另一种电解液充满。两缓冲液贮液槽中的电解液体积应当相同。每种电解液的浓度至少应为 0.1mol/L，并与末端组分即梯度形成时凝胶末端的组分相同。此外，除含有 H^+ 和 OH^- 外，两种电解液中均不得含有平衡离子。在对照凝胶上进行测定时，阳极电解液的 pH 应尽可能地接近 pH 梯度形成后凝胶阳极末端的 pH。借助电极夹（第 2 章图 1 中的盖 D）的水平面和调节仪器底座上的螺旋（同上图部位 B），使电泳仪处于垂直状态。对仪器的最后检查是凝胶的顶部及底部应无气泡。

步骤 4A：样品加于聚丙烯酰胺凝胶上

直径 0.6cm 的凝胶上每条区带可载 5—2,000μg 蛋白。聚焦电泳前，应将任何有可能影响梯度形成或蛋白质有效 pI 的非蛋白质污染物除去（如核酸）。实验表明，样品体积应小于 1ml，最好小于 0.5ml。为了便于染色，每区带最好负载 5—25μg；若进行制备，直径 0.6cm 的凝胶中每条区带可以容纳 1—2mg 样品，这由有关蛋白质之间的分离和分布的

重叠状况决定[19,33]。其它直径凝胶的载样量与凝胶的表面积成正比。

蛋白质样品既可以用上缓冲液贮液槽中的电解液，也可以用载体组分混合液来制备，在这两种情况下的 pH 中，蛋白质是带电的。例如，对于阴离子蛋白质来说，pI 范围为 7—9 或 8—10，其实际 pH 分别为 8 或 9 的混合物适于使蛋白质带负电荷。应当避免选用接近或等于样品的等电点 pH；若以 pI 范围为 3—10 的两性电解质混合物制备样品，或者在接通电源前令两性电解质混合物从凝胶中扩散到未经缓冲的样品中，常常容易做到这点。将载体两性电解质加到样品中的确会轻微改变凝胶的 pH 梯度，尽管这种影响在样品体积很小时微不足道。

加入 10—30% 蔗糖或甘油常使样品密度增加；但浓度过高可以引起凝胶表面脱水。为了便于观察样品，可以在样品中加入诸如伊凡斯蓝（Evans blue）(pI = 5.35）或甲基蓝（pI = 3.60）染料。这类两性染料在达到其等电位置时，又可以作为 pH 的标志物；然后迅速扩散。

若样品体积小，即在分析规模的凝胶中样品为 200μl 或不足 200μl，用 100μl Hamilton 注射器的针尖在上贮液槽电解液之下，很容易刚好在凝胶的表面将样品铺成一层。若样品体积较大则在加入上贮液槽缓冲液之前，先用吸管将样品加到凝胶表面；然后用 Pasteur 吸管吸取上贮液槽缓冲液，并细心地加在样品上，直至玻璃管完全充满。随后将上缓冲液加于上贮液槽中至所需要的水平。无论采用哪种加样方法，重要的是应保证样品和上贮液槽电解液之间的表面不被扰动。另一种加样方法是将样品加在凝胶聚合时的混合液中，与整个凝胶彻底混合。在分析复杂的混合物时，其组分的 pI 值差别很大时，这种方法特别有用。优点是能应用大体积样品，同时样品也不与强酸和强碱接触。主要的问题是，首先，聚合时部分蛋白质样品不可逆地吸留在聚丙烯酰胺凝胶基质上，这就增加了凝胶染色的背景；其次，样品可能被聚合反应修饰；最后，由于凝胶混合物的 pH 通常与蛋白质等电点的 pH 接近，因此蛋白质溶解度较低。

步骤 4B：样品加于柱形 Sephadex 凝胶上

若样品体积小（50μl 或更小），可用 Hamilton 注射器穿过聚丙烯酰胺凝胶塞将样品注入柱中。若样品体积大但又小于柱的空体积，则将载体组分透析至样品中，然后在聚丙烯酰胺凝胶塞形成之前，凝胶柱仍处于真空状态下直接将样品加在 Sephadex 柱上。为了控制加样过程，即防止样品在流入柱子时被流失，可以在加样前直接加数微升蓝色葡聚糖于柱中。遗憾的是，第二种加样方法不能使蛋白质在聚焦电泳前充分带电，因而在电聚焦前不能完全溶解，因为这时的蛋白质是在组分混合物的平均 pH 条件下加入。较大体积的样品只能以与聚丙烯酰胺凝胶柱相同的方式加样，即在聚丙烯酰胺塞的上方，以适当的阴极电解液或阳极电解液加样。显然，在这种情况下，凝胶塞对蛋白质应当是非排阻性的，故推荐采用 15% C_{DATD} 及尽可能低的%T（5%或更低）的凝胶作上部的凝胶塞。

步骤 5：聚焦电泳

若两性电解质混合物的 pH 或蛋白质通过的凝胶片段上暂时的 pH 对蛋白质无害和使蛋白质不溶解，那么应在聚焦电泳开始前加样。在这种状况下，样品加入后立即在每管直径为 0.6cm 的凝胶上加 1mA 的电流。当电压达到与仪器散热能力相适应的最大数值

时，通常为 20—40v/cm 凝胶，应将电源接至电压控制器上。

目前尚未见到瓦特控制数低于 1W 的电源。因此聚焦电泳一开始，至少用 5—10 只凝胶管实现对瓦特的控制。同样，在聚焦电泳的后一阶段，当电流逐渐降低时，电源的电压通常达到极限，电源自动地与电压控制接通。

采用强酸阳极电解液和强碱阴极电解液时，通过贮液槽的电压降可以忽略不计，整个系统可加 200V 电压，此数值大致与凝胶两端的电压相等。然而，当采用弱酸或弱碱性不带电的阳极电解液和阴极电解液时，通过贮液槽的电压降就大得多，此时不能忽略不计。因而必须放一对铂电极使之与上贮液槽中一条具有对照性的凝胶的顶部和底部接触(图 2)，并用一个外加的伏特计测量凝胶两端的电压，根据测量的数值来调节系统的电压。由于电泳时凝胶和贮液槽中的电压变化，系统的固定电压不能精确地维持在所希望的 20 或 40v/cm 凝胶，因此，在聚焦电泳过程中需要重新调节电压。最近，通过电源的改进，使得有可能控制凝胶管两端的电压，因而使这一问题得到了解决（An der Lan, B., Chidakel, B. E. 和 Chrambach, A. 正在制作)。

蛋白质的加样量对于起始电压的确定有明显的影响。当每条凝胶的蛋白质加样量超过 100—200μg 时，起始区带对电热效应极为敏感，其原因与制备性等速电泳中大量浓缩的情况完全相同(见第 3 章)，即在制备性等速电泳中，可能由于蛋白质将水和盐固定化；因此在蛋白质区带上产生了数值较大的电压降，这一效应通过在凝胶上形成一白色蛋白质沉淀带而显示出来。蛋白质带一旦出现，将加在凝胶上的电压调节到 20v/cm 或更低的范围，常能使蛋白质带消失。

加样前先形成 pH 梯度常常是有益的。这时对蛋白质接触的 pH 范围完全了解，因而能避免蛋白质在不利的 pH 条件下变性和沉淀，并能使区带朝蛋白质 pI 部位泳动的速度达到最大值。操作程序是在凝胶上加电压，并待电流以指数形式降至稳定的低值时再加样品。通常，每厘米凝胶加电压 20—40v，经 1 小时左右电流即降低到一适当数值。凝胶的预聚焦不能明显地减少在梯度消失前用于分离蛋白质的聚焦总时间。

在带电荷的还原剂存在的条件下进行预聚焦，也能减少或消除聚丙烯酰胺凝胶中的氧化因素[34]。可以用与加蛋白质样品相同的方法，将 5—20μM 预先用阴极电解液滴定到阴极端 pH 的巯基乙酸加到凝胶的阴极端，并令其在加入蛋白质之前迅速流过凝胶。另外，也可以在蛋白质样品下铺一层较浓的还原剂溶液，将还原剂与蛋白质同时加入(由于凝胶的还原作用与 pH 有关，故均一的还原作用需要巯基乙酸在 pH 梯度形成之前加入，即在加电压之前加入。但是在聚丙烯酰胺凝胶聚合作用完成之前不能获得这类均一的还原作用，这是由于聚合作用必须在氧化条件下进行。)

步骤 6A：聚丙烯酰胺凝胶的取出及 pH 梯度的测定

聚焦电泳在一定时间间隔内，如 4,8,16,24,48 小时相继取出凝胶管。在每支管的顶部塞一小橡皮塞。然后将凝胶管从贮液槽下部垫圈中抽出，同时凝胶管顶端的小塞将垫圈的小孔密封。然后从下部将小塞拉紧，再用洗瓶将橡皮塞周围的上缓冲液贮液槽的下表面洗净，以避免阳极电解液和阴极电解液之间的交叉污染。然后重新放置好贮液槽并对其余的凝胶继续进行聚焦电泳。某些工作者感到这种方法很难掌握，宁愿在凝胶管取出之前，将上贮液槽电解液倒出。必须十分细心，以免下贮液槽中的电解液污染上贮液槽

电解液。

凝胶的阳极端可以用插入一支皮下注射器针头形成的一个气泡来标志。为了使标志更明显，针头可以先蘸上不溶于水的标志物如印度墨水。用一支与注射器、虹吸管或自来水龙头相连接的23号6cm长的皮下注射针头，沿管壁注水将凝胶从玻璃管中冲出。从Gelamide 250涂布过的凝胶管中取出凝胶比从未涂布过的凝胶管中取出更为困难。而且由于在聚焦电泳中对机械性能不稳定的“非排阻性”凝胶的需要，以及凝胶的膨胀随pH值而异，取出凝胶时应格外细心。水应逐滴地从针尖流出，沿凝胶管壁注水时不要将针尖插入凝胶中；管应保持垂直状态，并紧靠工作台面，以便凝胶滑到工作台上时不致断裂；凝胶的二端均应沿管壁注水，直至凝胶不需要空气压力能自由地从玻璃管中滑出。

用接触电极进行人工操作或用如梯度监测装置一节详述的半自动pH梯度测量仪（图3），可以在活性测定或染色的同一凝胶上测定其pH梯度。将凝胶置于仪器槽中，并用0.025mol/L KCl溶液湿润，令接触电极以小于0.5cm/min的速度扫过凝胶，pH值则描绘在自动记录仪上。此外，将一条有代表性的凝胶切成薄片。再将切片浸于0.5ml KCl稀溶液中，手工测定pH值。设想的前提是，用于染色及活性分析的凝胶上的pH梯度与代表性凝胶上测得的pH梯度完全相同。这种假设要求各凝胶中的凝胶组分、体积、样品的离子强度和体积都完全一致。

步骤6B：Sephadex凝胶的取出及pH梯度的测定

聚焦后取出凝胶管并包以蜡膜，将凝胶管置于－20℃冰箱中直至完全冻结。由于凝胶管易于破碎，所以不提倡快速冷冻。在碎干冰的上面放置一块平玻璃即成为一个冷却的切割工作面。凝胶管用手稍许加温后，用一根合适的玻璃棒将冷冻的Sephadex凝胶从玻璃管中推至玻璃板上。这种操作应在对照凝胶上试验1—2次，以便估计需要融冻的最小程度。保持在室温下的刀片易于将冰冻的Sephadex切开，而冷冻过的刀片易使凝胶破裂。凝胶切片应当用冷却过的镊子夹取，并放入玻璃管中，用与聚丙烯酰胺凝胶切片相同的方式作pH或活性测定。

步骤7：染色或活性测定

聚焦电泳后凝胶的染色比PAGE更为困难，因为两性电解质具有与蛋白质相似的固定和染色性质。人们可以利用下列事实，即一般是蛋白质不溶于3.5%过氯酸（PCA），而两性电解质易溶[35]；另一方面，利用缓冲剂进行聚焦电泳，蛋白质可以用相当有效的固定剂三氯乙酸（TCA）固定[36]；两种情况下均可用考马斯蓝G-250染色。

若采用TCA为固定剂，Diezel等[36]叙述的方法较好。将每条凝胶浸泡在40倍过量的12.5% TCA中5分钟以固定蛋白质，然后加入足量的0.25%考马斯亮蓝G-250水溶液，使最终浓度达0.0125%。在染色液中浸泡30分钟后，将凝胶转移到一个装有9ml 5%醋酸的有螺旋盖的玻璃管中。蛋白质区带立即清晰可见而无明显的背景，其图象至少可以稳定数月。用于特殊的酸溶性蛋白质染色的改进方法见前文。

在Vesterberg的PCA方法中（参考文献[37]中的方法B），凝胶在40ml溶液A（236ml水中溶解9g磺基水杨酸，30g TCA）中60℃保温30分钟。然后放置在10ml装满溶液B（将0.1g考马斯亮蓝G-250，200ml水，8.7ml 61.3% PCA混合后再加水，使最

终体积为 300ml 并过滤)的有螺旋盖的试管中，再在 60℃下保温 30 分钟，凝胶贮存于稀释一百倍的 B 溶液中。

Sephadex 凝胶柱不能用通常的方法染色。用 Lowry 法测定洗脱液中的蛋白质浓度，可确定蛋白质带的位置，若洗脱液中蛋白质浓度太稀，则在进行蛋白质测定前用 TCA 沉淀。也许，常用于 Sephadex 薄层分离上的“接触印痕法”（“contact print technique”）能应用于 Sephadex 柱胶，因为它在 PAGE 中已应用于柱状凝胶。

为了进行活性测定，用前述方法将聚丙烯酰胺凝胶切成厚 1mm 的薄片，Sephadex 凝胶则用刀片切成相应的薄片。必要时，将凝胶切片在强酸或强碱性 pH 溶液中 0℃下培育一极短暂的时间，使等电状态的蛋白质沉淀物溶解。这一方法的主要问题是蛋白质变性。另一方法是将凝胶切片直接在分析用混合物中保温。任何一种能抑制等电沉淀的方法，如在凝胶中加入 20% 甘油[28]，或到达等电点后减少聚焦电泳的时间，看来均有利于活性的回收[30]。当蛋白质需要 Triton X-100 之类助溶剂以阻止等电沉淀时，应注意去污剂与载体两性电解质形成的复合物能不断地从凝胶中泳出；这可能使蛋白质发生不可逆沉淀[23]。同样，“非排阻性”的增加或基质吸附力的降低也有助于活性的回收。例如，Ultrogel（一种琼脂糖-聚丙烯酰胺混合的聚合物）[30] 或 Sephadex G-75（Ultrodex）（An der Lan. 等，在所引的书中）已成功地回收了蛋白质的活性，然而用聚丙烯酰胺凝胶却不能回收活性。

步骤8：用 pI' 鉴别蛋白质及其特征

与凝胶长度有关的区带距离及 pH 位置可用来确定某一区带的 pH 值。用这些 pH 值对聚焦电泳时间作图可得到一条曲线（图 5），曲线趋近于“平台”的数值即蛋白质特征性的 pI'。为了确定某一特定的区带是否是聚焦电泳产生的假象，将区带切下并将凝胶切片在同一系统中再聚焦，一般是有价值的。在某些情况下，例如当 pI' 值的物理化学意义显得重要时，人们也能够试验在 pI' 时蛋白质与载体两性电解质之间的缔合作用，方法是在诸如浓尿素溶液[23,28] 之类的解离介质中，或者是在以缓冲剂作载体组分的条件下进行聚焦电泳，或者是在凝胶的二端加样并比较所测得的接近平坦的 pH 值。

制备性凝胶聚焦电泳

与在蔗糖密度梯度中的聚焦电泳相比较，制备性凝胶聚焦电泳主要有三个优点：

(i) 当蛋白质加样量大时，蛋白质的等电沉淀对分离无干扰。

(ii) 凝胶基质作为一种抗对流基质，可以增加区带的清晰程度。

(iii) 洗脱时区带不出现互相混合。

与液相基质比较，凝胶聚焦电泳不足之处是，电泳分离后需要从凝胶切片中溶解、扩散或电泳出蛋白质。实际上，将凝胶切片并从凝胶切片中提取蛋白质是目前制备性凝胶电泳普遍应用的唯一方法。从凝胶切片中提取蛋白质的程序基本上遵循分析性聚焦电泳中所述的方法。此外，也可以应用前述的但经过以下改进的稳态浓缩法来获得。

仪器

凝胶聚焦电泳仪　如同 PAGE 和等速电泳法(见第 2 章和第 3 章)一样，制备性凝

胶聚焦电泳系通过增加凝胶的表面积来实现。凝胶的大小因而也是载样量受仪器实际散热速率的限制。虽然聚焦电泳的分辨率随凝胶长度的增长成比例增加，但等速电泳中的长凝胶管及位置较低的下贮液槽(第3章)仅在必要时使用。制备性聚焦电泳通常是在直径1.8cm的凝胶上进行，凝胶相当短，以便工作者得以利用分析性凝胶中所应用的相同的下缓冲液贮液槽(图1)。凝胶管需按前文所述的方法用 Gelamide 250 涂布，并以尼龙网作凝胶的机械支持物，因为在直径大的凝胶管中，欲使凝胶保持适当的粘壁性比在0.6cm分析性凝胶管中更困难。

切片器　　凝胶在pH梯度中的非均一性可能使得纵向或绝大多数横向金属丝切片器不适用于聚焦电泳的凝胶。为了将凝胶纵向切片，推荐手工操作切片机的刀片；需要横向切片时，可用膜切片器将15% DATD交联的凝胶切成厚2mm的切片。当用变阻器显著降低振动频率时，市售的电振动金属丝切片器也能切割直径1.8cm的凝胶。

pH梯度测量装置　　手工操作的接触电极方法可应用于大凝胶。此外，图3所描述的仪器配备有直径1.8cm的槽供选用。

电源　　凝胶直径越大，发散电热的效率越低。因此，制备规模的聚焦电泳的电压应低于分析性规模的电压。在典型的实例中[19]，观察到电压必须从适宜于分析性规模凝胶的15V/cm降至10V/cm。

程序

步骤1—3：凝胶聚焦电泳

提供最适分辨率[11]的分析性凝胶电泳条件可应用于一条或数条直径为1.8cm的凝胶，利用一个具有与凝胶管粗细一致的橡胶垫圈的上缓冲液贮液槽。其电压应当降低，而冷却剂的流动速度以及下缓冲液贮液槽中的磁力搅拌速度应加至最大，以补偿由于凝胶直径加大所致的散热速率降低。若数条凝胶同时电泳，那么各凝胶条的体积、离子强度及蛋白质加样量均应完全相同，以防止各凝胶之间电场强度不同。操作中的电压、蛋白质加样量以及凝胶的长度对于所需要的分离均应尽可能最大，这些参数应在进行制备性实验之前先在分析性规模中测定。每平方厘米凝胶的蛋白质区带可加入4—8mg蛋白质，这取决于聚焦电泳的条件和蛋白质[19,33]；每条凝胶所载的蛋白质量与凝胶表面积成正比。凝胶聚焦电泳开始时控制电流为$4mA/cm^2$凝胶，直至整个凝胶所加的电压达到10—12 V/cm。此后，应将电压维持在容许的最大数值。待有关的蛋白质到达其pI'，或在获得更好分辨率稍后的某一时间[11]，应结束聚焦电泳。

步骤4：凝胶的取出、切片，蛋白质的溶解、再分析和收集

应用与制备性等速凝胶电泳相同的方法(见第3章)，细心地从管中取出凝胶。用膜片切片器将凝胶切成厚2mm的切片。从含有等电沉淀带的凝胶切片中提取蛋白质需使其溶解。可以将它们在冰水浴中与偏碱的pH溶液短时间接触而使蛋白质溶解，并尽可能地减少同时发生的蛋白质变性。典型的方法如下：将每条凝胶相应部位的切片集中于闪烁瓶中，用0.05mol/L NH_4OH刚好浸没，在冰水浴上放置10分钟，然后以选作浓缩用的多相缓冲系统中的酸性组分或NaH_2PO_4中和。为了能在随后的凝胶电泳步骤中将蛋白质加入，在每一切片的悬浮液中加入蔗糖使最终浓度达10%，取部分溶液作分析性聚

焦电泳或 PAGE，切片悬浮液则贮存于 4℃。然后按区带图谱及时将切片集中。

步骤 5：蛋白质的回收

用第 3 章介绍的稳态浓缩提取和浓缩仪从收集的凝胶切片中回收蛋白质。选择从凝胶切片中提取和浓缩蛋白质的等速电泳缓冲液，完成稳态浓缩蛋白质的程序，以及最后除去非蛋白质的、聚丙烯酰胺类的污染物和非挥发性缓冲剂，其方法与第 3 章所叙述的相同。

直到最近，从聚焦电泳凝胶切片中回收蛋白质的产率约为 70%[19,39]。若凝胶切片在聚丙烯酰胺凝胶上用稳态浓缩法提取，数毫克样品蛋白质的纯度低至 50%，相反，若用琼脂糖进行稳态浓缩，蛋白质样品的纯度可高达 90% 以上[40]。

用凝胶过滤能从蛋白质中除去大部分载体两性电解质。用透析法，若结合作用相当强，则用电透析法可以定量地除去缓冲液载体组分，但不能除去商品性的合成的载体两性电解质混合物，因为这些混合物中，至少在某些情况下，含有分子量大且不能透析的成分；与特殊的人工合成的并具有正常分子量分布的载体两性电解质相比较，凝胶过滤时分子量大的成分除去较少[41]。在聚焦电泳前，将商品性的合成的两性电解质混合物预先通过 Amicon UM-2 超滤膜，可以避免产生这一问题。此外，工作者也可以用另外的滤除步骤如离子交换层析[42]，将残存的载体两性电解质混合物从蛋白质中除去，尽管由于所使用的特殊分级分离基质或容器壁的吸附作用，有可能损失部分甚至全部蛋白质。权衡损失蛋白质样品的风险，人们常常宁愿蛋白质样品中含有少量人工合成的载体两性电解质混合物。

第 5 章　双向凝胶电泳

John Sinclair 和 David Rickwood

导　　言

蛋白质的电泳分离已成为分离和检定各种蛋白质的主要方法之一，它不但应用于分析，而且用于制备。这种分离方式不仅取决于多肽的分子量，而且与整个分子的电荷有关，后者又由多肽的氨基酸组成、有无去污剂及溶液的 pH 决定。

正如在本书其它章节所详述的那样，有两种分离类型，一种是根据与多肽分子大小及净电荷数有关的泳动率，另一种类型则为平衡分离方法，诸如仅仅依据电荷而与其分子量大小无关的多肽分离方法——等电聚焦。不论选取哪种方法，的确存在着这种可能性，即两种或两种以上的多肽，特别是当最初的样品为复杂的蛋白质混合物时，能在同一个蛋白质区带中共同迁移。多肽的共同迁移不仅掩盖了蛋白质真实的复杂性，而且也掩盖了各区带中某些组成数量上的变化。由于上述原因，建立了经第一向电泳分离后再在与第一向呈垂直的方向上，作第二向电泳的双向分离方法。

双向电泳分离的设计应使多肽在各向上根据不同的原理进行分离。二向均依据相似的原理进行的多肽分离方法所获得的结果是一系列基本上呈对角线分布的点，其分辨率并不比单向分离的结果优越。而各向根据不同原理进行分离的双向电泳除能改善分离外，若细心地选择各向所应用的分离方式，还能另外获得与多肽基本参数有关的资料。例如，从 SDS 电泳结果可以估计多肽的分子量。另一方面，等电聚焦系基于多肽的等电点进行分离，而等电点反映出多肽的氨基酸组成，有时也反映出翻译后修饰的程度。因此，利用这两个因素，人们可以迅速估计蛋白质的分子量及等电点。

然而，蛋白质样品本身的性质可能限制了某些分离方法的应用。例如，某些蛋白质可能较碱或较酸，以致其等电点处于凝胶的 pH 梯度范围以外。此外，双向分离不能保证单一的点即代表单个多肽，尤其是当起始样品为多种蛋白质时（例如全细胞蛋白）更是如此；更确切地说，应用双向分离的目的是使多肽共同迁移的可能性减至最小程度。需要注意的另一因素是，致使多肽共同迁移的原因可能不是由于它们具有相似的大小或电荷，而是由于它们彼此发生相互作用，其结果是它们以聚集体的形式而不是以单一的多肽移动。核和膜中的蛋白质经常形成极稳定的聚焦物，因此，这类样品的分离必须在能确保其完全解离的基质中进行。本章叙述双向分离的某些方法及其在分离某些特殊样品时的改进。

仪　　器

大多数情况下，专门用于双向凝胶分析的仪器数量很少，如本节结束时所讨论的那

样，若需要以常规方法电泳大量凝胶，研制某种更为专一的、可以同时电泳几块凝胶的仪器是有价值的。

第一向凝胶

第一向凝胶电泳通常是在柱胶上进行，柱胶装于一个能容纳 8 或 12 支凝胶管的简单电泳仪中。某些情况下，也可以在板胶上电泳样品，然后将板胶切成条以便作第二向分离。板胶上电泳样品的优点是所有样品都在极其相同的条件下进行分离，因此，不同样品的分离状况比在不同的柱胶上进行的电泳分离更为相似。但另一方面，由于板状薄凝胶条的物理强度有限，因而在用缓冲液平衡的过程中，难于进行大量操作。再者，若第一向分离采用等电聚焦的方式，那么使用柱胶有助于样品在电泳前在整个凝胶中混合，而这种混合是某些方法所要求的。

第二向凝胶

第二向凝胶的分离总是在板胶上进行。早期的某些论文采用相当厚的板胶（0.35cm），以便与较厚的第一向凝胶一致。这种板凝胶的问题是不能完全干透；通常只有当凝胶厚为 0.15cm 或更薄时才能完全干透。用来支托板胶的材料也很重要。通常使用玻璃板，尽管它们容易破碎。塑料板虽然更耐用，但与玻璃板比较，导热性能差，不适用，因为凝胶极易发生过热，其结果导致蛋白质区带扭曲。

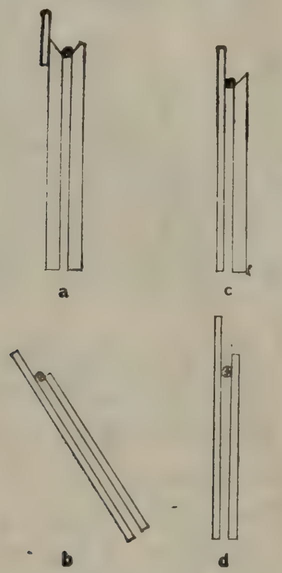


图 1　第一向凝胶加到第二向板胶上的方法。a，用切成斜角的板（厚 0.6 cm），b，用普通板（厚 0.3cm），c，斜角和正常板合并应用，d，将第一向凝胶挤压在厚 0.3cm 的板中间。

需要将第一向凝胶加于板胶上也影响板的设计。将第一向凝胶加到板胶上的具体方法多种多样，在某些情况下必须将板加以修改。实例之一是应用切成斜角的板（图 1a），由于这种板比通常的板厚，因而在顶部形成‘V’形，第一向凝胶可安放其中并起到密封的作用。凝胶电泳时，这些切成斜角的板还需要一块衬板。在某些情况下使用厚凝胶板能显著地减少凝胶的冷却，因而必须应用较低的电流以便使凝胶处于冷却状态。也可以应用正常的薄凝胶板，此时，可以将板倾斜而形成一条安放凝胶的槽（图 1b），并在相应的位置将凝胶密封。一块通常的衬板和一块切成斜角的板合并使用也同样有效（图 1c），其优点是比较简单，并且比两块均为厚玻璃的板更容易冷却。

上述各例中的一个问题是柱胶紧靠在板的顶部。若柱胶用前述系统的丙烯酰胺浓缩胶密封在相应的位置，由于空气阻止聚合作用，致使顶部的混合物不发生聚合，结果浓缩胶不可能将柱胶完全密封。一种可供选用的方法是，用琼脂糖将凝胶密封在应有的位置，尽管凝胶与热琼脂糖接触可能对所分离的蛋白质产生有害的影响。组装时将第一向凝胶挤压在凝胶板之间能解决这一问题（图 1d）。原来比板胶厚得多的柱胶可以满意地挤压进去，而凝胶及分离结果均不受这一方法的影响。这种方法一个较次要的缺点是，在制备第二向凝胶以前，

表 1 电泳多板胶的电泳仪

作者	凝胶板数	板胶大小	参考文献
E. Kaltschmidt 和 H. G. Wittmann	5	19×20cm	[13]
B. Dean	8	13×16cm	[21]
N. G. Anderson 和 N. L. Anderson	10	17×17cm	[20]
J. I. Garrels	4	20×17cm	[1]
M. I. Jones, W. E. Massingham 和 S. P. Spragg	10	17×17cm	[25]

必须用相应的缓冲液平衡柱胶。

上述类型的电泳仪只能容纳一块凝胶。作者实验室中有四套电泳仪同时操作，这种类型的仪器对许多用户是适用的。然而，在某些必须电泳多块板胶的场合中，应用一种能同时电泳数块板胶的电泳仪是值得考虑的。在这类电泳仪上电泳凝胶的另一优点是，各凝胶板均在同一条件下进行电泳，因此更便于进行比较。曾报道过宽度达 80cm 的极宽的凝胶[1]，但已研制的绝大多数类型的电泳仪是用来电泳数块标准尺寸的凝胶。图 2 为多板胶电泳仪的实例，表 1 列出了某些参考文献，若读者欲组装这种类型的仪器，可在这些文献中找到有益的资料。然而，重要的是应该认识到不仅存在着操作大量凝胶的问题，而且也存在着将大量凝胶染色、脱色、照象以及在某些场合下进行放射自显影的问题。经常面临的问题不是电泳大量的凝胶，而是在电泳后对大量凝胶进行处理的问题。

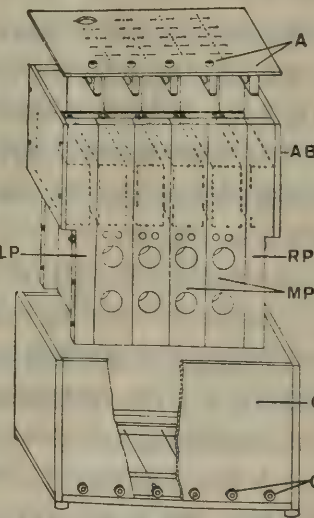


图 2 电泳多块板胶的电泳仪。图中所示为仪器的透视图。A，装有阳极端的有机玻璃板；MP 为中间部分；RP 和 LP 分别为仪器的右侧和左侧；AB 为阳极贮液槽；CB 为阴极贮液槽；C，阴极端（经允许从参考文献[13]复制）。

双向凝胶电泳的一般技术

操作双向凝胶的技艺只能在实验室中通过实践来掌握，而且操作的实际步骤将取决于实际应用的双向技术。本节专门论述大多数双向凝胶电泳分离通常采用的实验技术及一般程序。此外，读者应当阅读第 1 章涉及单向凝胶电泳一般技术的有关章节。

溶液和仪器

如前所述，丙烯酰胺溶液有剧毒，故操作时必须极其谨慎。双向凝胶电泳应用的溶液与单向分离中所使用的相似。然而，双向分离的整个操作更复杂，因此，只要有可能，用来制备和电泳凝胶所需要的所有溶液，都应该预先制备成贮备液。大多数溶液可以贮存于 −20℃ 或在抑菌剂诸如氯仿存在的条件下贮于 5℃。在这方面存在着某种限制。例如，应在制备凝胶的当天配制过硫酸铵溶液。此外，溶液中尿素的存在能导致氰酸根离子的形成，它能修饰和降解多肽。氰酸根离子形成的速度随温度升高而增加，但加入含游离氨基的化合物可以中和形成的氰酸根离子。因此尿素溶

液应当在临用前制备，并在应用前通过一混合树脂柱除去离子，然后保持冷却状态，如有可能即用 Tris 缓冲液缓冲。

最初，在需要还原剂的操作中采用 2-巯基乙醇。然而，当达到有效浓度(约 10m mol/L) 时，2-巯基乙醇抑制聚丙烯酰胺凝胶的聚合。因此，如有可能应当使用在低浓度时即有效的还原剂如二硫苏糖醇。在下述方案中，应用 2-巯基乙醇可能对凝胶产生有害影响的各种情况，均用二硫苏糖醇作为还原剂。不同于原始方案之处均在正文中予以指明。另一种聚合抑制因素是氧，因此在用前将凝胶溶液真空脱气能促进聚合速度；这一措施也可以减少凝胶聚合时气泡的形成。

如前节所指出，双向凝胶所应用的仪器完全是常规性的电泳仪。最为重要的是保证凝胶管和凝胶板清洁，以便保证凝胶均一地粘附于玻璃上。用板胶进行分离时凝胶易于撕裂，这时清洁问题尤为重要；凝胶板必须用铬酸清洗，再用蒸馏水洗涤，随后以乙醇冲洗并干燥。有些方法也推荐在用前将凝胶管和凝胶板硅烷化，但这种操作却产生了凝胶，尤其是用于第一向丙烯酰胺百分浓度低的柱胶，可能从玻璃管中滑出。于是在应用硅烷化的凝胶管时，最好在电泳凝胶之前先用尼龙网或开孔的蜡膜盖在凝胶管的底部。

样品的制备

样品和加入样品的溶液随分离类型的不同而有极大的差别。因此，在样品的制备方法上也存在相似的差异，本文仅给予一般的提示。读者应当查阅本书前述的相应章节。

制备样品最重要的原则也许是确保样品溶液中不含有因蛋白质凝聚而产生的颗粒物质，否则由于聚集物在样品缓冲液中缓慢溶解，而可能出现明显的条纹。作为一个常规的预防措施，是在样品加于第一向凝胶之前，将样品在微型离心机（microfuge）上离心（约 10,000 × g） 5 分钟。

另一问题可能是样品中有与多肽相互作用的核酸，它们对在凝胶上获得的分辨率将产生不良的影响。在一向应用了聚焦电泳的双向凝胶电泳中，这个问题显得尤为严重。因此，特别是从核蛋白复合物中制备蛋白质时，必须采取将核酸污染减至最少的步骤。

某些场合下，通过选择性地提取或沉淀步骤可以除去核酸，如从染色质中用酸提取组蛋白[2] 及用氯化锂沉淀 rRNA 从核糖体中分离核糖体蛋白。用速度区带或等密度离心法能除去高分子量的核酸[4]。由于在 CsCl 或 Cs_2SO_4 梯度上不能形成小颗粒状的大蛋白质凝聚物，同时等密度离心也可用来浓缩蛋白质样品，因此 CsCl 或 Cs_2SO_4 梯度的等密度离心分离常被认为是较好的分离方法。某些蛋白质经等密度离心后，在梯度上部形成的小颗粒很难溶于尿素，甚至不溶于 SDS，在这种情况下，最好降低样品的载量或降低梯度溶质的浓度，以确保蛋白质在梯度中形成区带。上述离心方法不能除去分子量较低的核酸。

将样品通过离子交换剂柱也能除去样品中的核酸。可以利用的离子交换剂之一是羟基磷灰石，该物质甚至在含高浓度解离剂如尿素或盐酸胍的高离子强度溶液中，也易于结合核酸[4]。上述各种离子交换柱方法的问题是由于离子交换剂的非特异性吸附可能使样品损失。此外，核酸的吸附条件可能导致某些强酸性蛋白质选择性地损失。

最后一种除去核酸的方法是用特异性核酸酶消化核酸。然而，这种方法无疑是在样品中加入了额外的蛋白质，除非应用与 Sepharose 连接的不溶性酶类。极为重要的是确保

样品和核酸酶中无蛋白水解酶的活性。最后，蛋白质样品与核酸结合能部分地抑制核酸酶的活性。

在速度区带电泳的分离中，加入标志出离子前沿的染料有助于保证蛋白质不致于泳至凝胶的底部以外。在平衡法如电聚焦的实例中，应将凝胶电泳不同的时间，或者在凝胶的两端加样，以确保多肽达到平衡位置。

第一向凝胶的制备

这是双向凝胶分离中最简单的一向。用第1章详述的方法在凝胶管中制备凝胶，用本章后节叙述的任一方法分级分离蛋白质。应当强调指出，双向分离的最终效果与第一向分离的结果密切相关。因此，读者应当准备尝试改变本章叙述的方法，以获得最佳的分离效果。只要凝胶的方向及其性质被清楚地标明后，电泳后的凝胶（仍在玻璃管中）可贮存于 −20℃ 的低温冰箱中。

平衡第一向凝胶以便进行第二向分离

碎裂玻璃管取出凝胶，必要时用注射器针头沿管壁注水轻轻挤压凝胶并从管中推出。经冰冻再融化的聚丙烯酰胺凝胶一般易于从管中取出。重要的是不应将皮肤上的蛋白质转移至凝胶上，所以在进行这一操作时均应戴软塑料手套。此外，不要让凝胶与任何纸张接触，因为凝胶特别是百分浓度低的聚丙烯酰胺凝胶，易于粘附在上述表面上。若必须将凝胶平放，应将凝胶放置在铝箔槽中；否则应将它们放在手套的掌心位置。

第一步工作是标明凝胶的上、下端，显然，在用各种缓冲液平衡凝胶的整个过程中始终保持这些方向的标志是极其重要的。作者实验室是在凝胶的一端插入一段细金属丝（直径约 0.1mm）来标记。在速度区带电泳时，金属丝标志物具有二种效果；若电线插在通常用标志染料表明的离子前沿，那么在进行第二向分离前在这一部位切断凝胶，即便凝胶电泳的距离不同，人们也能使凝胶上各点的位置标准化。在平衡系统的情况下，不存在离子前沿，仅需简单地采用一个固定的常规惯例，例如，总是标志出凝胶的底边。百分浓度低的聚丙烯酰胺电聚焦的凝胶从玻璃管中移出后其酸性末端膨胀，这有助于鉴别凝胶的两端。除利用金属丝标志出凝胶的一端外，也可以向凝胶的一端注入少量印度墨水。

在这一阶段中，也可以将凝胶放在适当的加以标明的铝箔槽内贮存于 −20℃ 的低温冰箱中。在这一条件下多肽既不降解，蛋白质区带也不会扩散。

下一步骤是平衡柱胶以便进行第二向电泳。应当强调的是，平衡的时间、温度及缓冲液多少都带有经验性质。在各种方法中建议平衡的总时间从 5 分钟至 2 小时不等。时间过长和温度过高则增加分子的扩散速度，因而对最终获得的分辨率可能产生不良影响。若凝胶电泳类型与发表的方法完全相同，则已发表的方法应当是满意的。然而，读者可能希望在其自身进行的具体分离工作中获得最佳的平衡条件。

平衡过程中的问题之一，是它不仅使凝胶中的 pH 和离子含量平衡，而且也导致凝胶中的大分子物质丧失。这种作用可能有助于从等电聚焦的凝胶中除去低分子量的两性电解质。然而，不太理想的是凝胶中的多肽，特别是低分子量的多肽可能损失。平衡时多肽的损耗可能高达 25% ，因而对于载量低的蛋白质来说，这种损失可能是特别严重的问题。平衡前将凝胶染色可以极大地减少蛋白质的损失。染色步骤固定了多肽，并使平衡

时蛋白质的扩散作用降至最低。进行第二向电泳时，这一步骤似乎不会导致多肽在第一向凝胶上滞留量增加。本法的一个优点是在进行第二向电泳之前有可能分析多肽的分布。

第二向凝胶的制备

在平衡第一向凝胶时，及早地安装电泳仪并着手制备第二向凝胶是可取的。按照标准方法制备聚丙烯酰胺板胶。分离胶可以是均一的，对于极不均一的样品也可以是梯度胶，或为线性梯度，或为指数梯度，可用适宜类型的梯度仪制备。制备这类梯度时，从一块凝胶到另一块凝胶其梯度图形总可能发生某种变化，因此，在第二向上电泳适当的标准标志多肽是合适的。若样品混合物中含有截然不同的泳动率高和泳动率低的组分，可采用不连续梯度，虽然在这种凝胶上进行分离常在两种浓度凝胶的界面上产生假带。若样品多肽具有相似的泳动率，那么用单一浓度的凝胶常常可以获得最适的分离效果，这种凝胶不仅较为简便，而且结果的重现性也最好。

通常将第一向凝胶放在板胶的顶部，并用百分浓度低的聚丙烯酰胺浓缩胶密封在相应的位置上。重要的是浓缩胶的聚丙烯酰胺百分浓度要小于它所包围的第一向凝胶，否则相当数量的蛋白质将保留在第一向凝胶中。用聚丙烯酰胺浓缩胶密封第一向凝胶时，最接近空气的凝胶常常不能聚合而遗留在暴露的凝胶顶部，并能对第二向分离产生不良的影响。这一问题能够得到解决，象通常一样在分离胶的顶部加浓缩胶，然后用适当缓冲液配制的1％琼脂糖将第一向凝胶密封于这一位置；这一方法已被广泛采用。用琼脂糖在相应位置上密封凝胶时，通过吸干浓缩胶顶部的液体并完全吸去平衡后第一向凝胶上的过量液体，可以提高分辨率。无论应用哪种方法，重要的是确保第一向凝胶尽可能放直，并使第一向凝胶的周围无气泡。在密封凝胶装置前，应在板胶的一端制备样品池，以便用标准的标志多肽来校正凝胶，此时常加入标志染料。然后将凝胶置于垂直板电泳仪上电泳，直至标志染料到达凝胶的底部。

多肽分布的分析

检测多肽的方法主要分成二类；染色法及用于放射性标记多肽的放射自显影法。大多数染色步骤极为相似，与第1章单向凝胶电泳中所述及的方法无明显差别。

检测多肽的染色步骤

经常改变的因素是染色剂浓度、染色溶剂的组成、凝胶染色时的温度及染色的时间。另外，在许多情况下所采用的条件常常属于经验性的，虽然某些研究已指出，某些染料，最明显的是考马斯蓝，比其它染料更敏感，能在凝胶上检测微克数量级的多肽。

表2所列出的染色方法已用于本章后文所述及的凝胶分离方法中，是染色步骤典型的范例。许多染色技术是相似的，本书的结尾处能查到大量文献。

与含两性电解质的凝胶或第一向凝胶含有两性电解质的第二向凝胶染色有关的问题之一，是两性电解质本身具有小肽的行为。因此它们能结合SDS并进入凝胶中，泳动至紧靠染料前沿的后部，并与大部分用来检测蛋白质的染料相结合。若板胶的丙烯酰胺百分浓度高，或板胶的底部丙烯酰胺百分浓度高的梯度凝胶，那么有可能让标记染料与两性电解

质一道泳出凝胶末端。高浓度丙烯酰胺将使多肽样品移动速度减慢，因而防止了样品从凝胶底部逸出。也设计了某些其它不同的方法以减少两性电解质的干扰。例如，如 O'Farrell 述及的[10]，将凝胶浸于 50% 乙醇、7%（体积/体积）冰醋酸和 0.005% 考马斯蓝中（防止多肽脱色），可除去大部分两性电解质而仅在染料前沿留下一条极细的区带。此外，与多肽结合的染色剂的色泽通常与两性电解质的不同，这使二种染色带能清楚地区别开来。不过可能产生染色后的两性电解质掩盖了低分子量多肽存在的问题。在这种情况下必须提取两性电解质。

其它显现多肽的方法，一般比常用的多肽染色法较少使用，但不需要染色或脱色，它是将凝胶在 25℃下浸于 10 倍体积 4mol/L 醋酸钾中经历 2 小时，使游离的 SDS 沉淀。其结果是除 SDS 与多肽结合的部位外，凝胶变得不透明[5]。某些特殊类型的多肽常常能以其特殊的性质进行检测。例如，在未变性的凝胶中，能进行分光光度分析的酶可以通过在合适的酶分析混合物中将凝胶保温，使其专一性地染色，而糖蛋白能用过碘酸盐-Schiff 反应检测[6]。附录 I 列出了检测凝胶中多肽方法的参考文献目录。

放射自显影检测标记多肽

如前所述，放射性同位素的应用对多肽的定位提供了一个极为灵敏的方法。与通常的染色法所获得的灵敏度相比较，其灵敏度提高 4 个数量级。样品载量的降低在定量和定性上极大地提高分辨率。

表 2　聚丙烯酰胺凝胶染色技术一览表

染色方法	脱色方法	备注	参考文献
A. 在含 0.1% 考马斯蓝的甲醇，水，醋酸(5:5:1)中浸 3—4 小时	对甲醇，水，醋酸 (5:5:1) 扩散过夜		[19]
B. 在含 0.1% 考马斯蓝的 50%TCA 中浸泡 20 分钟	用 7% 醋酸换液数次	除去两性电解质	[10]
C. 在含 0.55% 胺黑的 50% 醋酸中浸泡 15 分钟	在 1% 醋酸中浸 40 小时		[13]
D. 在含 0.25% 考马斯蓝的甲醇水:醋酸(5:5:1)中浸 3 小时	用含 5% 甲醇的 10% 醋酸换液数次		[18]
E. 在含 25% 异丙醇，10% 醋酸，和 0.025—0.05% 考马斯蓝溶液中浸泡过夜，随后在含 10% 异丙醇，10% 醋酸和 0.0025—0.005% 考马斯蓝溶液中浸泡 6—9 小时	用10%醋酸换液数次	另一任选的染色步骤是在含 0.0025% 考马斯蓝的 10% 醋酸中浸泡过夜，有助于使凝胶图谱更清晰	[12]
F. 在含 1% 考马斯亮蓝 R250，7.5% 醋酸和 50% 甲醇的水溶液中浸泡 1—4 小时	在含 7.5% 醋酸和 50% 甲醇的水溶液中过夜		[14]
G. 在含 0.1% 胺黑 0.7% 醋酸和 30% 乙醇的水溶液中于 80℃ 浸泡 3 小时或室温下过夜	在含 7% 醋酸和20%乙醇的水溶液中换液数次		[15]

将细胞与放射性氨基酸接触，可以在活体中标记蛋白。然而，内源性氨基酸库经常妨碍这种标记程序，同时前体的代谢也能导致非特异性的掺入。蛋白质在体外合成或化学修饰如碘化[7]或还原性甲基化[8]（此过程涉及蛋白质的某些氨基与甲醛和氢硼化钠反应）进行标记，可获得更高的放射性比活性。上述两种试剂均能用同位素标记。可应用于体外标记蛋白质的方法的完整文献参见附录 II。电泳后检测放射性标记蛋白质的放射性自显影和荧光显影程序，已在第 1 章中详述。

如上文所述，用放射性氨基酸标记体内蛋白质，能对在代谢过程生成的其它大分子引起无规则的标记（randomisation）。同样，研究体内蛋白质翻译后的修饰作用如磷酸化和乙酰化，也能受无规则标记的影响。例如磷酸盐容易掺入到脂类，蛋白质和核酸中，而脂类和核酸的污染在分析磷蛋白时很可能引起问题。甚至在体外标记蛋白时，许多反应也标记诸如核酸和脂类等的污染物，而后者可能掩盖多肽在凝胶中的分布。从放射自显影的聚丙烯酰胺凝胶中除去核酸污染物的典型方法是电泳凝胶后，再将凝胶在 7%TCA 中浸 2 小时，随后在 7%TCA 中于 90℃ 温育 30 分钟使核酸水解。用 7% 以上浓度 TCA 洗涤凝胶以除去标记的核苷酸，按要求皱缩、干燥后再作放射自显影。然而，在某些场合下，例如在等电聚焦中，样品电泳前必须除去核酸，以便得到最佳的分离效果；这点将在本章的其它部分予以讨论。

双向凝胶电泳的比较分析

通常凝胶电泳是在一个、二个或多个不同的样品比较的基础上进行的。用板胶进行单向电泳分离时，各样品均在相同的条件下电泳，电泳条件的任何微小变化对样品的影响均相同。然而，除非使用专门的电泳仪，否则双向凝胶通常只能分离一种样品。由于诸如等电聚焦凝胶的 pH 梯度范围和形状的微小变化，在未平衡凝胶上电泳的距离，以及第一向凝胶放置在板胶上的伸展程度，使凝胶的图谱很少能完全重复。因此，用蛋白质的绝对迁移距离来分析蛋白质，即便不是完全不可能，也是困难的。

虽然已应用与计算机联用的微型光密度显示仪（mirodensitometric tracings）进行分析[9]，但大多数分析是利用凝胶某些区域重合的可能性，通过视觉观察某些待研究斑点的有无或强度的减少的方法来进行。多数情况下以大的蛋白质斑点作为内标准或参比点，并通过与这些标志物的相对位置比较来分析次要蛋白。如有可能，特别是在第二向上，应电泳标准蛋白，以便对电泳不同时间的凝胶进行比较。当将蛋白质合成与用标记氨基酸进行的放射自显影斑点的相对强度联系起来时，应当认识到不同多肽中某一氨基酸的百分含量变化极大。例如，若以[^{35}S]-甲硫氨酸作为标记氨基酸，为了说明这一事实，即某些蛋白质，如抗生物素中甲硫氨酸的含量约为大多数其它蛋白质的 2—4 倍，必须作某种校正。对于任何一种标记氨基酸，同样的理由也是成立的，除非待比较的蛋白质的氨基酸组成已知，否则不能进行校正。若蛋白质标记是在体内进行，细胞内的氨基酸库不仅在不同的细胞类型之间，而且在同一细胞的不同生理状态下均有明显差别。由于单个斑点的大小既与曝光时间又与蛋白质斑点的放射性有关，这也能引起困难。例如，二个或三个位置非常接近的蛋白质斑点，在放射自显影上可能显现为一个斑点。缩短放射自显影曝光的时间有时可以解决这一问题。同样，若利用同位素标记来分析蛋白质的修饰作用，斑点强度的增加既可能是由于修饰蛋白质数量的增加，也可能是由于该蛋白质修饰作用的增强。考马斯蓝染色能有助于区别这两种不同的情况。

根据等电点及分子量进行蛋白质双向分离

虽然有各种不同类型的蛋白质双向分离方法，作者还是选取这种方法及与其有关的改进方法作为主要方法，这不仅是由于它已表明适用于种类繁多的蛋白质，而且也由于它

既能提高多肽的分辨率，又能提供有关多肽的分子量、氨基酸组成及在某些场合下它们的翻译后修饰作用的信息。这种简单的方法有许多变动，本文仅述及为大多数人确认的在第一向进行等电聚焦、第二向进行 SDS 凝胶电泳的方法。

等电聚焦分离多肽的技术系以多肽的等电点为基础。因此，可以获得有关蛋白质氨基酸组成的信息。蛋白质的分子量仅影响蛋白质到达其等电点的速度，由于分离作用是一种平衡分离，只要 pH 梯度维持稳定，电泳时间不影响所获得的分离效果。这种形式的分离，随后在第二向上以分子量为基础进行的分离，通常为 SDS-PAGE，极大地促进了多肽定性任务的完成。这种类型的双向分离能揭示出有关多肽的其它信息，加上其固有的灵敏度及高分辨率，使其在各种蛋白质的分离和分析中成为一种极有价值的工具。

第一向分离

第 4 章已详细叙述了等电聚焦在蛋白质分离中的应用，建议读者参阅该章节以便掌握这一技术的基本知识。通常是使商品性的两性电解质在凝胶两端施加的电场作用下形成聚焦的 pH 梯度(见第 4 章)。pH 梯度一般在电泳第一小时内形成，多肽的移动较为缓慢，最终在梯度中到达其等电位置，此时蛋白质不带净电荷，因而停止移动。只要聚焦时间足够，蛋白质将仅仅根据其等电点在凝胶中占有位置，而与其它因素无关，然而应当记住，在采用变性条件时，变性多肽的等电点可能与天然蛋白质的不同。虽然本法是一种平衡法，但许多因素能够影响所获得的分离效果。不同商标，甚至同一商标的不同批号的两性电解质可能不同，因而产生的梯度稍有差异。此外，梯度易朝碱性端漂移。这两种困难都可以通过检查与其它凝胶同时制备并同时电泳的空白凝胶的 pH 梯度来克服。其它必须注意的问题是某些多肽样品的等电点可能位于梯度范围之外，因此它们可能迁出凝胶。同时，由于等电聚焦是极其灵敏的方法并且能分辨差异仅为一个电荷的蛋白质，因此，十分重要的是应当避免采用任何可能导致多肽发生化学修饰的步骤，以免产生人为的微小不均一性的假象。

某些工作者已经建立了一种将等电聚焦和 SDS-PAGE 合并应用的双向分离方法。然而，正是 O'Farrell[10] 最先提出用同位素标记蛋白质有可能分离数千种不同的多肽。利用灵敏度较低的常用染色方法能够分离的蛋白质数量少得多，这是由于在第一向凝胶中加样量必须更多。O'Farrell 设计的方法已广泛应用于分离原核和真核有机体的蛋白质，并能用来分离多种类型的细胞蛋白。然而，重要的是不能盲目应用这一方法，因为这一方法不适用于所有的蛋白质。

如前文所述，由于这一分离方法对多肽的电荷非常敏感，因此必须避免任何可能引起样品等电点人为地发生改变的任何步骤(见一般技术)。核酸含量高的样品在聚焦电泳前必须进行处理以除去核酸，否则它们能与碱性蛋白质和两性电解质反应。反应的结果是使第一向凝胶上多肽斑点模糊不清或出现条纹。用一般技术章节中述及的任一常规方法可除去核酸。

所应用的凝胶和缓冲系统见表 3。将凝胶混合物脱气，然后加入 10μl 新配制的 10% 过硫酸铵起动聚合反应。将凝胶溶液吸入凝胶管(内径 0.25cm，长 13cm)至距顶端 0.5cm 处，覆盖一层水放置约 60 分钟。吸去覆盖物后，在凝胶的表面上加 25μl 样品缓冲液再平衡 1 小时，样品缓冲液配制如下:

9.5mol/L 尿素
5%2-巯基乙醇
2%Nonidet P-40
1.6% Ampholines (pH5—7)
0.4% Ampholines (pH3.5—10)

除去样品缓冲液后，凝胶放置在电泳仪中，电泳仪的下槽装有 10m mol/L H_3PO_4 并

表 3 第一向等电聚焦凝胶的制备(O'Farrell法)[a]

制备 10ml 第一向凝胶混合液:
5.5g 尿素(超纯级)
1.33ml 28.38% 丙烯酰胺，1.62% 双丙烯酰胺
2ml 10% Nonidet P-40(NP40)
0.4ml 40% Ampholines (pH5—7)
0.1 ml40% Ampholines (pH3.5—10)
1.95ml 水
5μl TEMED
10μl 10% 过硫酸铵

a. 另一种制备 DATD-交联凝胶的配方见第 4 章。

与阳极端相连，上槽装有 20m mol/L NaOH 并与阴极端相连。每条凝胶上铺 25μl 左右新配制的样品缓冲液，首先在 200V 预电泳 15 分钟，然后在 300V 预电泳 30 分钟，最后在 400V 再预电泳 30 分钟。预电泳凝胶后，从上缓冲液贮液槽中除去 NaOH，并细心地吸去凝胶上部的液体。通常是将 25μl 内含 20μg 左右放射性标记蛋白质的样品缓冲液加于凝胶上。若凝胶上部的空柱小于 1cm，加入的样品最多可达 100μl。若样品不是复杂的多肽混合物，凝胶上的加样量可以减少。若多肽欲用考马斯蓝染色法检测，则加样量应增至 50—250μg 蛋白质，其数量取决于样品的复杂程度。然后以 10μl 覆盖缓冲液[9mol/L 尿素、0.8% Ampholine (pH5—7)，0.2% Ampholine (pH3.5—10)] 覆盖样品。再用新配制的 20mmol/L NaOH 充满上缓冲液贮液槽，继续在 400V 电泳 13.5 小时或在 300V 下电泳 18 小时。在上述两种情况下电泳至最终时，将电压增至 800V 使区带清晰。

轻轻加压将柱胶从玻璃管中挤出，再用 5ml 由 2.3%SDS、5%2-巯基乙醇、10% 甘油和 62.5mmol/L Tris-HCl(pH6.8) 组成的 SDS 样品缓冲液平衡二次，每次 60 分钟。

第二向分离

制备一块丙烯酰胺浓度为 10—16% 并呈指数梯度浓度形式的板胶，板胶宽 16.4cm、高 14.6cm 和厚 0.8mm，浓缩胶为 4% 丙烯酰胺浓度凝胶。分离胶是用 2 个如表 4 所示的丙烯酰胺贮备液制成的梯度溶液，利用梯度发生器制备而成。在凝胶溶液即将注入梯度发生器之前加入过硫酸铵。将脱气的稀溶液(16ml)注入标准的指数梯度发生器的贮液槽中，并将 5ml 已脱气的浓溶液注入用磁力搅拌器不断搅拌的混合室中。打开两槽间的连通管，通过重力或蠕动泵以 5ml/min 左右的流速灌注凝胶，直至凝胶距玻璃板顶部约2.5cm。凝胶灌注装置的混合室中仍然存留一定数量的丙烯酰胺溶液，极为重要的是在

凝胶溶液聚合前应将装置中的凝胶弃去并冲洗整个装置。在凝胶上覆盖一层水，放置约一小时。吸去覆盖层以后，再加稀释 4 倍的分离胶缓冲液，并将凝胶放置过夜。

表 4　第二向分离凝胶的制备（O'Farrell 法）

分离胶	
稀溶液:	
	4ml 0.4% SDS, 1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)
	5.3ml 29.2% 丙烯酰胺，0.8% 双丙烯酰胺
	6.7ml 水
	8μl TEMED
	25μl 10% 过硫酸铵
浓溶液	
	2ml 0.4% SDS, 1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)
	4.3ml 29.2% 丙烯酰胺，0.8% 双丙烯酰胺
	1.7ml 75% 甘油
	4μl TEMED
	10μl 10% 过硫酸铵
浓缩胶	
	1.25ml 0.4% SDS, 0.5 mol/L Tris-HCl(pH6.8)
	0.75ml 29.2% 丙烯酰胺，0.8% 双丙烯酰胺
	3.0ml 水
	5μl TEMED
	15 μl 10% 过硫酸铵

在平衡第一向柱胶时，按表 4 的方法制备浓缩胶，加入 10% 过硫酸铵以起动聚合反应。除去梯度分离胶上的缓冲液覆盖层，将浓缩胶注入板的顶端。通过覆盖一层水或在凝胶上方放一条 Teflon 胶带排去浓缩胶上的空气，以保证与空气隔绝。聚合后除去覆盖层或 Teflon 条，用水洗涤凝胶顶部，用滤纸吸干或吸去过量的液体。柱胶密封于浓缩胶上取决于应用哪种双向凝胶板，吸取少量热的含 1% 琼脂糖的 SDS 样品缓冲液，加到本章前述的凝胶板的倾斜角中，或者是加到将板倾斜成一定角度所形成的槽中。应当小心操作以确保柱胶周围无气泡。琼脂糖将柱胶密封于浓缩胶中约需 5 分钟。凝胶在 20mA 恒定电流下电泳 4 小时左右，或在标志染料逸出凝胶之前（见下文），采用 0.192mol/L 甘氨酸、25m mol/L Tris 碱和 0.1% SDS 为电极缓冲液，外加二滴 1% 溴酚蓝作标志染料。电泳后从凝胶板之间细心取出凝胶，用放射自显影或考马斯蓝染色（见表 2，程序 B）对多肽定位。应用这一技术的典型分离见图 3。

用前文给出的配方在第一向凝胶中形成的 pH 梯度，大约在 pH7 以上趋向于不稳定。如前所述，用不同类型的两性电解质可能获得不同的结果，因此，为了进行比较性研究，应当采用相同的两性电解质。两性电解质系统的限制在于梯度的 pH 范围。虽然 pH3.5—10 的 Ampholines 的 pH 范围较广，但它并不包含所有的蛋白质类型。例如，极碱或极酸的多肽或是不能进入凝胶，或是逸出凝胶之外。若第一向的电泳缓冲液互换位置，并将样品加于柱胶的酸性末端，在定量上也能观察到相似的结果，同时可以发现，若采用这种程序，碱性多肽更易于聚焦（见后文）。范围狭窄的 pH 梯度能够有效地分离不太复杂的混合物或已知等电点的样品，而范围宽的 pH 梯度对复杂的蛋白质混合物具有最佳的分离效果。若欲应用窄范围的 pH 梯度，则必须改变第一向的缓冲系统。采用放射性标记蛋白

质并用放射自显影检测，其灵敏度比通常的染色法提高 4 个数量级*以上。因此，能观察

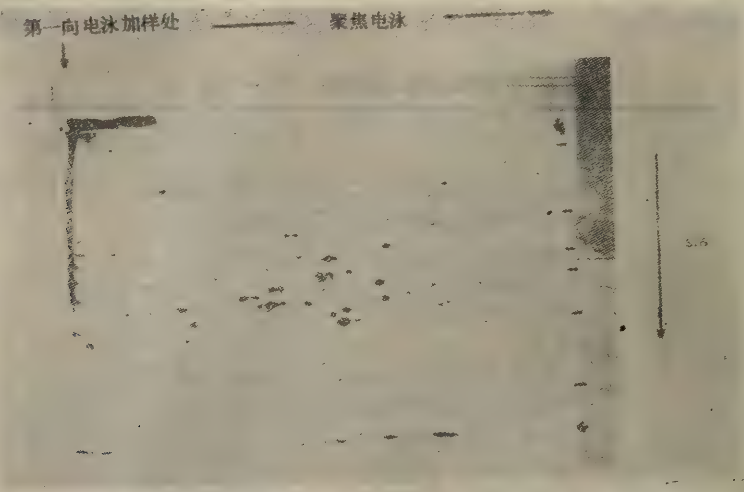


图 3 用 O' Farrell 法进行蛋白质的双向分离。全部细胞蛋白质用 [^{35}S]-甲硫氨酸标记，用正文所述的 O'Farrell 技术分离，多肽用放射自显影定位。

到占总蛋白质 10^{-4}—10^{-5}% 的蛋白质。如此高的灵敏度及分辨率对众多的不同类型蛋白质的分析是极有价值的。

基本技术的改进

在 SDS 存在下已经溶解的样品，通过简单地加入固体尿素至最终浓度为 9.5mol/L 后仍然可以在第一向凝胶上电泳。由于在高浓度尿素和非离子去污剂存在下，蛋白质与 SDS 的反应很小，SDS 在这种环境中似乎不影响蛋白质的等电点。若人们欲获得良好的分离效果，上述方法的缺陷之一是样品的体积受限制，而这一点是极为重要的。作者实验室中常规性地应用一种能加更大样品体积的类似系统于第一向电聚焦的凝胶中，它能避免由于样品加于极酸或极碱的环境中可能产生的电聚焦的矫作物。虽然样品会发生某种程度的吸留，但可以增加样品体积来有效地补偿这一缺点。另外，pH 梯度在更高的 pH 范围时倾向于更稳定。第一向凝胶按照表 5 的配方单独制备。凝胶混合物脱气，加入 10% 过硫酸铵以起动聚合作用。凝胶注入长 14cm、内径 0.25cm 的凝胶管中，使胶长 10cm，用水覆盖并放置 60 分钟。将凝胶转移至电泳仪中，在上贮液槽（阴极）为 5%1,2-二氨基乙烷，下贮液槽（阳极）为 5%（正）磷酸的条件下，以 150V 恒压电泳 24 小时。电泳后，轻轻加压将凝胶挤出，并进行第二向分离的平衡。凝胶分别用 50ml 下列缓冲液于 37℃ 振摇 30 分钟。即：

(i) 8mol/L 尿素，0.1mol/L 磷酸钠（pH7.0），1% SDS，1m mol/L 二硫苏糖醇，5mmol/L Tris 碱。

(ii) 8mol/L 尿素，0.01mol/L 磷酸钠（pH7.0），1%SDS，1mmol/L 二硫苏糖醇，5mmol/L Tris 碱。

(iii) 8mol/L 尿素，0.01mol/L 磷酸钠（pH7.0），0.1% SDS，1mmol/L 二硫苏糖

* 原文为 4 倍。——译者注

醇，5mmol/L Tris 碱。

第二向凝胶与 Laemmli 的凝胶系统相似，但由含 4mol/L 尿素的 5—20% 线性丙烯酰胺梯度浓度组成，其浓缩胶为 4% 丙烯酰胺，并按照表 6 给予的配方制备。

凝胶板的底部用 10ml 浓溶液再加入 5μl TEMED 和 0.2ml 新配制的 10% 过硫酸铵经聚合后来密封。核黄素溶液（表 6）也用于聚合反应；在稀的及浓的溶液行将注入梯度发生器之前将核黄素加入溶液。凝胶用 5ml 覆盖的缓冲液覆盖，覆盖的缓冲液系由 2.54ml 3mol/L Tris-HCl(pH8.8)、17.26ml 水和 0.2ml10% SDS 相混合来制备；并借助荧光源使其聚合。在加入浓缩胶之前，处于这一阶段的凝胶可放置过夜。

表 5 第一向电聚焦凝胶的制备

0.5ml 溶于 8mol/L 尿素溶液中的样品，其蛋白质含量达 800μg
0.133ml 28.38% 丙烯酰胺，1.62% 双丙烯酰胺
0.3g 超纯尿素
0.2ml 10% Nonidet P-40
0.05ml40% Ampholines (pH3.5—10)
2μl TEMED
5μl 10% 过硫酸铵

表 6 第二向分离凝胶的制备

分离胶
稀溶液 (30ml)：
1.5g 丙烯酰胺
0.04g 双丙烯酰胺
3.75ml 3mol/L Tris-HCl (pH8.8)
0.3ml 10%SDS
9ml 水
10μl TEMED
15ml 8mol/L 尿素
1.5ml 核黄素 (8mg/ml)
浓溶液 (30ml)
6.0g 丙烯酰胺
0.16g 双丙烯酰胺
3.75ml 3mol/L Tris-HCl (pH8.8)
0.3ml 10% SDS
4.5g 蔗糖
3ml 水
10μl TEMED
15ml 8mol/L 尿素
1.5ml 核黄素 (8mg/ml)
浓缩胶
2.5ml 1mol/L Tris-HCl (pH6.8)
1.75ml 40% 丙烯酰胺，1.06% 双丙烯酰胺
5.15ml 水
10ml 8mol/L 尿素
0.2ml 10% SDS
7.5μl TEMED
300μl 5% 过硫酸铵

浓缩胶用 Teflon 条密封并待其聚合 60 分钟。聚合后，除去 Teflon 条，将凝胶顶部吸干。除以 1mmol/L 二硫苏糖醇代替 5% 2-巯基乙醇外，按照 O'Farrell 方法将柱胶安放在凝胶的顶部。在浓缩胶的一端制作一个用于标志蛋白质单向分离的样品池，标志蛋白质是用 8mol/L 尿素、50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、10%SDS、1%2-巯基乙醇、10% 甘油及 2 滴 1% 溴酚蓝制备而成。溴酚蓝作为追踪染料。凝胶板以 0.192mol/L 甘氨酸、25mmol/L Tris 和 0.1%SDS 作电泳缓冲液，在 150V 恒压下电泳过夜或直至追踪染料逸出为止。电泳后从凝胶板中细心地取出凝胶，在 0.1% 考马斯蓝的水:甲醇:醋酸(体积比 5:5:1) 混合液中染色 3—4 小时，用不含考马斯蓝的上述溶液脱色，换液数次过夜。典型的分离图谱见图 4。

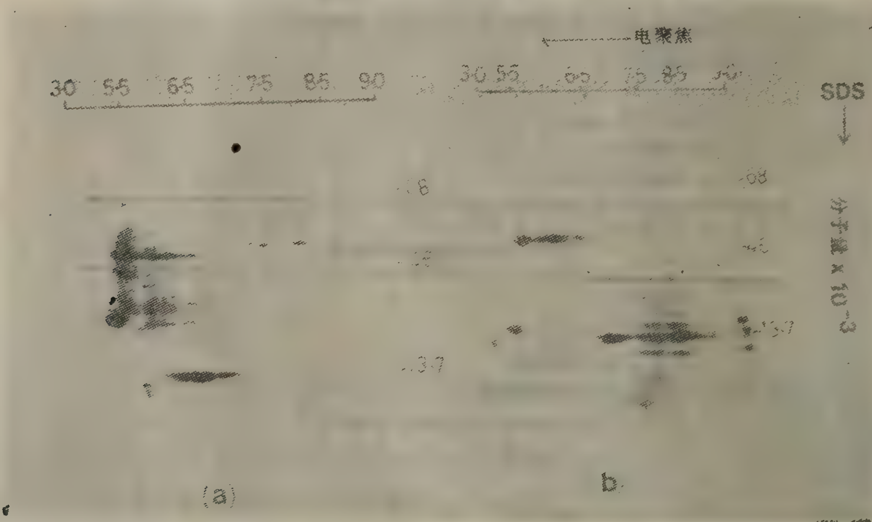


图 4 用改进的 O'Farrell 系统对蛋白质进行双向分离。(a) 胞浆蛋白质和 (b) 盘基网柄菌细胞核经等密度离心除去核酸污染物，再进行双向凝胶电泳分离，如正文所述第一向为等电聚焦 (EF)，第二向为 SDS-PAGE。

影响分离的因素

若采用这一方法，则样品在掺入到电聚焦的凝胶中之前，必须先将样品充分透析，使样品中高的离子浓度降低。已发现 SDS 能干扰第一向分离；虽然它不影响蛋白质的等电点，但 SDS 确实对 pH 梯度的线性状态产生不良的影响。与各种等电聚焦分离有关的一个问题是产生已在第 4 章中详加讨论的所谓梯度漂移现象。幸运的是，这种影响只是在电泳超过 24 小时以上才真正变得明显。最近已尝试用等电聚焦方法来分离碱性蛋白质。这一方法称之为非平衡 pH 梯度电泳法，它将样品朝阴极电泳一短暂时间[11]。这种分离方法采用的凝胶系统与 O'Farrell 最初设计的相同，唯一的差别是凝胶不必预电泳，并且只需在 400V 下电泳 4—5 小时。由于这种系统不再是平衡系统，再一次指出，为了比较电泳结果，将电泳条件标准化是极为重要的。这种改进的真正不利之处在于只能提供很少甚至不能提供有关多肽等电点的信息。

膜蛋白分离的改进

前节所述及的基本的双向分离技术已广泛应用于具有各种不同性质的蛋白质。然而，用这种技术分离膜蛋白是困难的，因为膜蛋白易于凝聚。但是在这种情况下，采用离子型和非离子型的去污剂，有助于对原核及真核细胞膜蛋白获得高分辨率的分离。Ames 和 Nikaido[12] 已经成功地分离了细菌胞膜蛋白、哺乳动物细胞膜蛋白以及病毒蛋白的制剂。将膜或包膜蛋白在含 2%SDS、0.5mmol/L $MgCl_2$ 和 50mmol/L Tris-HCl (pH6.8) 溶液中，70℃ 加热 30 分钟溶解，悬液经冷却离心，再用 2 倍体积的样品稀释缓冲液（9.5 mol/L 尿素；由 0.4%pH3.5—10，0.8% pH5—6，0.8% pH6—8 组成的 2%Ampholines；5%2-巯基乙醇；8% Nonidet P-40）稀释。为了防止第一向的斑点出现条纹，令 Nonidet P-40 与 SDS 最终的百分比为 8 是极其重要的。

除柱胶中的 Ampholines 总浓度为 2%（由 pH4—6，pH6—8 和 pH3.5—10，体积比为 2:2:1 组成），以及将 0.4ml(0.14mg/ml) 核黄素和 1%（体积/体积）TEMED 加到 15ml 凝胶混合液以起动聚合反应外，聚焦电泳均按前节所述的方法进行。凝胶灌注后其上再覆盖一层 8mol/L 尿素。用日光灯照射使聚合反应进行 30 分钟。然后每条凝胶上最多加入 100μl（约 100μg）的蛋白质(见前节)，不必预电泳，凝胶在 300V 下电泳 18 小时，随后在 400V 下电泳 1.5 小时，以便获得明显的区带。第二向分离为 SDS-PAGE，采用 Laemmli 的不连续缓冲系统，用 30% 丙烯酰胺、0.8% 双丙烯酰胺贮备液制成的 10% 丙烯酰胺作分离胶，5% 丙烯酰胺作浓缩胶。第二向凝胶的制备见表 7。凝胶混合物脱气，加入新配制的 10% 过硫酸铵溶液使聚合。按表 7 所述制备 20ml 5%丙烯酰胺浓缩胶。浓缩胶混合液脱气，加入新配制的 10% 过硫酸铵使聚合。灌注分离胶（厚约 1mm）后，其上为厚 2.5cm 的浓缩胶。平衡等电聚焦的凝胶，并用热琼脂糖密封于浓缩胶上。第二向电泳最初在 15mA 恒流下开始，随后增至 30mA 电泳，直至溴酚蓝标志染料泳出凝胶为止。电泳后从凝胶板上细心地取出凝胶，然后染色、脱色使多肽显现出来(见表 2 程序 E)。

表 7 用于分离膜蛋白的第二向凝胶的制备

分离胶
供制备 40ml 10% 丙烯酰胺分离胶用:
13.3ml 30% 丙烯酰胺，0.8% 双丙烯酰胺
0.4ml 10%SDS
7.5ml 3mol/L Tris-HCl(pH8.8)
10μlTEMED
18.7ml 水
0.1ml 10% 过硫酸铵
浓缩胶
3.33ml 30% 丙烯酰胺，0.8% 双丙烯酰胺
0.2ml 10%SDS
2.5ml 1 mol/L Tris-HCl(pH6.8)
5μl TEMED
14ml 水
50μl 10% 过硫酸铵

特殊类型蛋白质的分离

合并应用等电聚焦和 SDS 凝胶电泳可以分级分离大多数的蛋白质。然而，某些类型蛋白质的分离通常应用其它的双向分离系统，这不是由于样品不适于较常用的方法，就是由于历史的原因已建立了其它的方法。作为后一种情况的一个实例是，核糖体蛋白质总是采用一种标准系统进行分离，这是人们最早设计的一种双向系统，它使各研究者对不同类型核蛋白体的研究结果得以进行比较，目前已为人们普遍接受。

虽然本节所叙述的方法已应用于某些特定类型的蛋白质，但并不意味着这一技术不适用于其它类型的蛋白质。因此，万一经常合并应用的等电聚焦和 SDS 凝胶电泳技术不适用，下述方法之一可能给出所需要的分辨率。

核糖体蛋白

由 Kaltschmidt 和 Wittmann[13] 设计并经 Howard 和 Traut[14] 加以改进的方法，常用来分离原核细胞和真核细胞的核糖体蛋白。其第一向为不连续的凝胶，第二向为连续的凝胶，两向中均含有高浓度的尿素。第一向柱胶的样品置于大孔径的琼脂糖凝胶中，而琼脂糖凝胶则位于孔径较小的丙烯酰胺分离胶的中间。Kaltschmidt 和 Wittmann 最初应用大孔径的丙烯酰胺凝胶，但由于蛋白质在丙烯酰胺样品胶中不迁移而使样品遭到损失，这就导致利用 Howard 和 Traut 设计而加以改进的琼脂糖样品凝胶的方法。在改进的条件下，样品胶中总电荷为阳性或阴性的蛋白质将在相反的方向上浓缩和移动。

第一向凝胶和缓冲液的组成按照表 8 制备。将凝胶溶液脱气，再加入 1.5ml 新配制的 7% 过硫酸铵令其聚合。溶液量足以制备 20 支柱胶。长 18cm、内径为 0.5cm 的玻璃管，一端以蜡膜或类似的材料或橡皮塞密封(见第 1 章)。分离胶灌注至玻璃管的一半，其上覆盖一层水，放置 40 分钟待凝胶聚合。聚合后除去覆盖层。将 0.1—0.15ml 含蛋白质 50—100μg 的样品，在 65℃ 下与等体积 1% 琼脂糖电泳缓冲液 (pH8.6) 混合。电泳缓冲液 (pH8.6) 的制备如下：

360g 尿素
2.4g EDTA-Na_2
9.6g 硼酸
14.53g Tris 碱
水加至 1L

将琼脂糖样品铺于分离胶上并覆盖一层水，放置待固化。除去覆盖层后，用分离胶填装凝胶管直至距顶部 0.3cm，并再以水覆盖，放置待其聚合。第一向电泳在 pH8.6 的电泳缓冲液中进行，阴极与上缓冲液贮液槽相连，缓冲液中含 0.5% 焦宁 G(pyronine G)作追踪染料。最初在 3mA/管条件下电泳 30

表 8　用于分离核糖体蛋白质凝胶的制备[13,14]

第一向凝胶 (pH8.6)	
	54.0g 尿素
	6.0g 丙烯酰胺
	0.2g 双丙烯酰胺
	1.2g EDTA Na_2
	4.8g 硼酸
	7.3g Tris 碱
	0.45ml TEMED
	水加至 148.5ml
第二向凝胶 (pH4.5)	
	36g 尿素
	18g 丙烯酰胺
	0.5g 双丙烯酰胺
	0.96ml 5mol 氢氧化钾
	0.58ml TEMED
	5.3ml 冰醋酸
	水加至 96.7ml

分钟使蛋白质浓缩，然后将电流增至 6mA/管继续电泳 5—6 小时，直到追踪染料到达凝胶底部。电泳后，细心地挤出柱胶，每一柱胶在 150ml 平衡缓冲液（pH5.2）中平衡，平衡缓冲液的组成如下：

8mol/L 尿素

0.074% 冰醋酸

12mmol/L 氢氧化钾

平衡 60 分钟期间，至少换液 2 次

然后将柱胶转移至板电泳仪中，用第二向分离胶（pH4.5）密封，其组成见表 8。

溶液在临用前脱气，每 10ml 凝胶溶液加入 33μl 新配制的 10% 过硫酸铵待其聚合。将含 0.1% 焦宁 G 的 20% 甘油作为追踪染料铺在已浸没在电泳缓冲液中的柱胶上部，每升电泳缓冲液含甘氨酸 14g 和冰醋酸 1.5ml，其 pH 值为 4.0 板胶电泳时阳极位于上部，在 40V 下电泳 30—60 分钟使蛋白质浓缩，然后电压增至 80—150V，继续电泳 6—12 小时。实际应用的电压对蛋白质的分离结果影响很小，除非电压导致大电流，因此选择某一特定电压的主要标准通常是根据是否便利。电泳后，从凝胶板上取出凝胶并染色(见表 2 操作步骤 C 或 F)。图 5 显示一种代表性的分离结果。

另一种代替将样品置于琼脂糖样品凝胶中的方法，是将等量的蛋白质加于二条较短的分离胶上(每条凝胶长 9cm)。凝胶中的一条以 0.5% 焦宁 G 作追踪染料，从阳极到阴极的方向电泳，另一条则以 0.1% 溴酚蓝为追踪染料，从阴极至阳极的方向电泳，电泳条件与前述的条件相同。凝胶按前述的方法平衡后放置在板电泳仪中，两条胶的样品起始点彼此相邻并位于凝胶板的中央，按前述的方法进行第二向电泳。

由于这种分离方法在第二向采用了连续缓冲系统，因此，在进行第二向分离之前，必

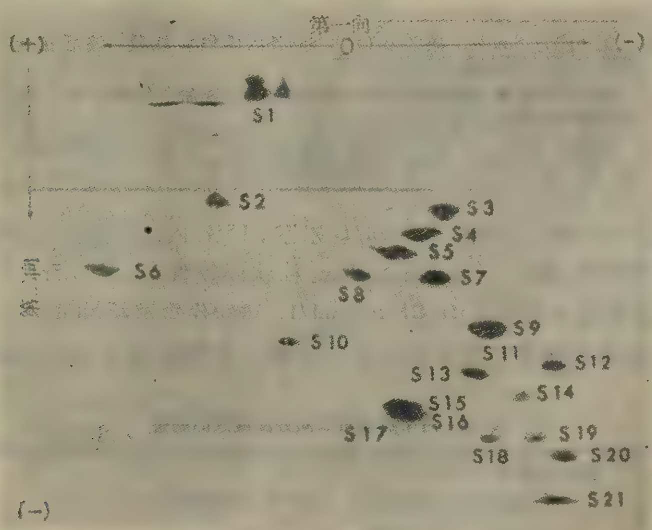


图 5 核糖体蛋白的双向分离。用 3mol/L LiCl，4mol/L 尿素提取 *E. Coli* MRE600 30S核糖体亚基蛋白，并按正文中所述的方法用双向凝胶电泳分离(经允许从参考文献[14]复制)。

须用缓冲液连续平衡以降低柱胶的离子含量。否则，当蛋白质从低导电区移向高导电区时所能观察到的区带区分明晰的现象不能出现。

某些相应的改进，其中包括改变第一向分离胶的组成和 pH 值，以及在第二向中加入 SDS，已经成功地用于核糖体蛋白的分离。本文中不拟详加讨论，但本法的扼要叙述及其参考文献可参阅表 9。

组蛋白

用等电聚焦方法分离组蛋白所遇到的困难，使得人们选用另外的双向分离技术。在低浓度丙烯酰胺，低 pH 条件下分离组蛋白是基于反映组蛋白的氨基酸组成的电荷。而在 SDS 存在的条件下组蛋白的分离则是根据组蛋白的分子大小，虽然与其它的蛋白质相比较组蛋白的迁移不规则。其它分离方式取决于非离子型去污剂诸如 TritonX-100，TritonDF-16 或 Lubrol-WX 与蛋白质结合的程度，它与蛋白质的疏水程度成正比。这种结合极大地减少了蛋白质的泳动率，同时分离的各种组蛋白的亚型不同于用酸性尿素或 SDS-PAGE 所获得的结果。

如 Hoffman 和 Chalkley[15] 所述，在第一向为酸性尿素凝胶和第二向为 Triton-酸性尿素凝胶的双向系统中，已极其成功地分离了组蛋白。由于在这类凝胶系统中组蛋白的分离基础不同，通常可以得到良好的分离结果。应用 Triton 凝胶所遇到的一个问题，是组蛋白中特别是甲硫氨酸的氧化而出现虚假的电泳图谱的可能性。Triton 对氧化后的组蛋白亲和力较低，这可能导致出现人为的异质性。因此，将组蛋白维持在还原环境中，例如 1mmol/L 二硫苏糖醇，以阻止氧化作用的发生是有益的。这种分离方法的缓冲液与凝胶系统见表 10。

表 9　用于分离核糖体蛋白的其它双向凝胶电泳方法

作者	凝　　胶	参考文献
L. J. Mets 和 L. Borograd	第一向为 8mol/L 尿素 pH5.0 的 4%丙烯酰胺柱胶，随后在含 SDS 的 10 %丙烯酰胺板胶上分离	[22]
O. H. W. Martini	第一向为尿素-醋酸盐的 4% 丙烯酰胺柱胶，随后在含 SDS 的 12%丙烯酰胺板胶上分离	[23]
W. L. Hoffman 和 R. M. Dowben	先用含 Triton X-100 的尿素-醋酸盐 (pH4.5) 的 8%丙烯酰胺柱胶，随后在含 SDS 的 15% 丙烯酰胺板胶上分离	[24]

凝胶溶液系由 0.9mol/L 醋酸、2.5mol/L 尿素、15% 丙烯酰胺和 0.1% 双丙烯酰胺组成。将凝胶混合液脱气，灌注入 0.3cm × 7cm 柱状凝胶管中，用 0.5ml 0.9mol/L 冷醋酸覆盖。聚合后柱胶放置在电泳仪中，以 0.9mol/L 醋酸作电泳缓冲液，在 130V 电压下预电泳 4 小时。然后将样品置于柱胶的顶部，室温下在电流为 1.5mA/凝胶从阳极到阴极

表 10　用于组蛋白双向分离凝胶的制备

第一向凝胶

3.0ml 40% 丙烯酰胺，0.267% 双丙烯酰胺

1.0ml 43.2% 冰醋酸，4%TEMED

4.0ml5mol/L 尿素，0.2% 过硫酸铵

第二向凝胶

3.0ml 40% 丙烯酰胺，0.267% 双丙烯酰胺

1.0ml 43.2% 冰醋酸，4%TEMED

4.0ml 2%Triton X-100，5mol/L 尿素，0.2% 过硫酸铵

方向电泳约 2 小时。可用甲基绿为追踪染料，在这一系统中，该染料蓝色组分的迁移恰在组蛋白 H4 之前。

第二向凝胶的制备见表 10。将溶液脱气，按上述比例混合。然后将凝胶混合液灌注入凝胶板中，以形成 0.3cm×14cm×10cm 的板胶，其上再覆盖一层由 0.9mol/L醋酸、1% Triton X-100 组成的溶液待凝胶聚合。聚合后，以 0.9mol/L 醋酸、1% Triton X-100 作电泳缓冲液，在 20mA 恒流下将板胶预电泳 12 小时，预电泳后倾去电泳缓冲液，并用 2ml Triton 凝胶混合物将第一向凝胶密封于板胶上。凝胶上再覆盖一层由 0.9mol/L 醋酸、1% Triton X-100 组成的溶液，并使其聚合约 1 小时。然后用 0.9mol/L 醋酸、1% Triton X-100 溶液作电极缓冲液，在 20mA 恒流条件下将第二向凝胶从阳极向阴极方向电泳 15 小时。电泳后，细心地从凝胶板上取出凝胶，在含 0.1% 胺黑的 0.7% 醋酸和 30% 乙醇的溶液中，80℃ 3 小时或在室温下过夜染色，然后在 7% 醋酸和 20% 乙醇中脱色。

在作者实验室中，组蛋白及来自较低等真核生物的"类组蛋白"的双向分离，第一向通常采用酸性尿素凝胶，第二向则为高 pH 的 SDS 凝胶分离。酸性尿素系统系 Reisfeld 等[16]的改良法，SDS 板胶则来源于 Thomas 和 Kornberg[17] 的方法。

除 9mol/L 尿素外，所有溶液均能冰冻在暗处贮存数周。分离胶（pH4.7）是按照表 11 所列配方制备。加入过硫酸铵之前，用醋酸将按比例混合后制得的凝胶混合物 pH

表 11 用于分离组蛋白的双向凝胶的制备

第一向凝胶
分离胶:
4.0ml60% 丙烯酰胺，0.4% 双丙烯酰胺
2.0ml 0.48mol/L KOH，17.2% 冰醋酸，4% TEMED
9.0ml9mol/L 尿素
50μl15% 过硫酸铵
浓缩胶:
2.0ml 10% 丙烯酰胺，2.5% 双丙烯酰胺
1.0ml 0.048mol/L KOH，2.87% 冰醋酸，0.46%TEMED
4.0ml 9mol/L 尿素
1.0ml(0.4mg/ml) 核黄素
第二向凝胶
分离胶（50ml):
30ml 30% 丙烯酰胺，0.15% 双丙烯酰胺
0.5ml10%SDS
12.5ml 3mol/L Tris-HCl(pH8.8)
12.5μl TEMED
加水至 50ml
浓缩胶（20ml):
3.33ml30% 丙烯酰胺，0.8% 双丙烯酰胺
0.2ml 10% SDS
2.5ml1mol/LTris-HCl(pH6.8)
10μl TEMED
加水至 20ml

调节至 4.7。将凝胶混合物脱气后，加入新配制的 15% 过硫酸铵以起动聚合反应，然后将凝胶混合液灌注入 14cm × 0.5cm 的柱状凝胶管中直至 10cm 刻度处。凝胶用一层水覆

盖，并放置1小时待其聚合。聚合后除去覆盖物，代之以约 150μl 按照表 11 的配方制成的浓缩胶。再覆盖一层水，日光灯照射 30 分钟使其聚合。聚合后，将 100-200μl，含 200—300μg 组蛋白的 7mol/L 尿素样品溶液加于浓缩胶上，在 150V 条件下，用每升含 31.2gβ 丙氨酸和 8.0ml 冰醋酸的溶液作电泳缓冲液，从阳极到阴极方向电泳 3 小时。可用溶于尿素中的焦宁G作标志染料。电泳后，加压将柱胶轻轻推出，37℃ 下在下列缓冲液中依次平衡 1 小时。

(i) 1%SDS，1mmol/L 二硫苏糖醇，0.1mol/L 磷酸盐，10mmol/L Tris-HCl(pH7.0)；

(ii) 1%SDS，1mmol 二硫苏糖醇，0.01mol/L 磷酸盐，10mmol/L Tris-HCl (pH7.0)；

(iii) 0.1%SDS，1mmol/L二硫苏糖醇，0.01mol/L 磷酸缓冲液，10mmol/L Tris-HCl(pH7.0)。

平衡后将柱胶转移至第二向凝胶上。

将凝胶混合液脱气，加入 125μl 新配制的 10% 过硫酸铵以起动聚合反应。灌胶后，用 0.75mol/L Tris-HCl(pH8.8) 和 0.1%SDS 组成的溶液覆盖，待其聚合 1 小时。聚合后，倾去覆盖层，用少量不含过硫酸铵的浓缩胶溶液湿润分离胶的顶部。分离胶系按照表 11 制备。

加入 100μl 新配制的 10% 过硫酸铵使浓缩胶聚合并以水覆盖。聚合后除去覆盖层，用 62.5mmol/L Tris-HCl (pH6.8)，2.3%SDS，1mmol/L 二硫苏糖醇的 1% 琼脂糖将柱胶密封在浓缩胶上。可用溴酚蓝作标志染料。然后用 0.05mol/L Tris 碱，0.38mol/L 甘氨酸和 0.1%SDS 组成的溶液作电极缓冲液，在 150V 恒压下将凝胶电泳过夜，或直至标志染料逸出凝胶为止。电泳后从凝胶板上细心地取出凝胶，在含 0.1% 考马斯蓝的甲醇:水:冰醋酸 (5:5:1 体积比)溶液中染色 3 小时。在不含考马斯蓝染料的同一溶剂中扩散过夜脱色。组蛋白典型的分离图谱见图 6。

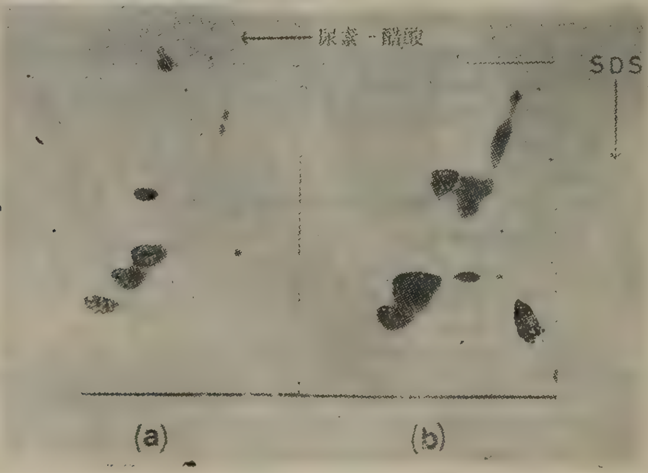


图 6　组蛋白的双向分离。(a) 从盘基网柄菌纯化的组蛋白，(b) 从小牛胸腺纯化的组蛋白，用正文所述的方法进行双向凝胶电泳分离。

核蛋白

由于蛋白质凝集所引起的问题使分离核糖体的方法不能应用于某些蛋白质，尤其是

核蛋白的分离。 Orrick 等[18]已经建立了一种高分辨率的双向分离系统用来分离核和核仁的提取物,它可以用来代替由 O'Farrell[10] 设计并已广泛应用的分离方法。该方法是在酸性 pH 条件下,用连续缓冲系统作第一向分离,随后在尿素和 SDS 存在下以分子量为基础进行第二向分离。凝胶按表 12 所示配方制备。

表 12　用来分离核蛋白的凝胶的制备

第一向凝胶
5.0ml 含 40% 丙烯酰胺，1.4% 双丙烯酰胺的 4mol/L 尿素溶液
5.0ml 含 4%TEMED 的 2mol/L 尿素溶液
5.0ml 0.21%过硫酸铵，21% 冰醋酸的 6mol/L 尿素溶液
第二向凝胶
18ml 20% 丙烯酰胺,0.52% 双丙烯酰胺的 8mol/L 尿素溶液
7.5ml 0.2%TEMED, 0.4%SDS 的 0.4mol/L 磷酸钠(pH7.1)
4.5ml 0.5% 过硫酸铵的 8mol/L 尿素溶液

将凝胶灌注入长 12cm，内径 0.5cm 的凝胶管中使胶长为 9.5cm。 放置 60 分钟令其聚合。用含 0.9mol/L 醋酸的 4.5mol/L 尿素作电极缓冲液，在 120V 下预电泳 2 小时,然后将 20—50μl 由 0.9mol/L 醋酸,10mol/L 尿素，1% 2-巯基乙醇组成的含蛋白质约 500μg 的样品混合液加于凝胶上，继续在 120V 相当于每管凝胶 2.5mA 的条件下电泳 5 小时。

第一向凝胶电泳后,可以将凝胶纵向切开,以便可以直接用染色法观察到蛋白质在凝胶中的分布。 另一半用来进行第二向电泳。 凝胶依次在下列溶液中于 45℃ 保温 35 分钟:

(i) 2%SDS, 0.1mol/L 磷酸钠, 6mol/L 尿素, 1mmol/L 二硫苏糖醇1) (pH7.1);

(ii) 1%SDS, 10mmol/L 磷酸钠, 6mol/L 尿素, 1mmol/L 二硫苏糖醇1) (pH7.1);

(iii) 0.1%SDS, 10mmol/L 磷酸钠, 6mol/L 尿素, 1mmol/L 二硫苏糖醇1) (pH

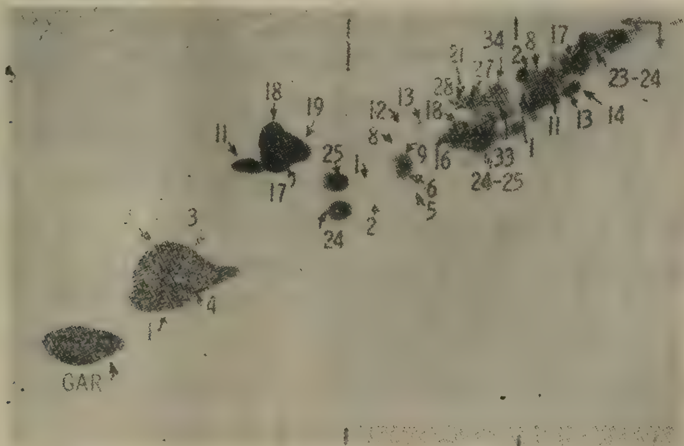


图 7　核仁蛋白的双向分离。从纯化的大鼠肝细胞核仁中提取的酸溶性核仁蛋白，按正文所述方法作双向凝胶电泳分离。

1) 原始论文中用 1%2-巯基乙醇作还原剂。

7.1)。

按表 12 所述制备第二向凝胶。将用这种方法制成的 25ml 凝胶混合液注入以形成 10cm × 9.5cm × 0.3cm 的凝胶板，加一层水覆盖。

用 SDS 缓冲液平衡的部分柱胶缓缓地浸于密封凝胶的混合液中，此混合液除含最终浓度为 10mmol/L 的磷酸盐（pH7.1）外，其余各成分均与第二向板胶相同。以约 5ml 密封胶将第一向凝胶与第二向凝胶粘接。用含 0.1%SDS 的 0.1mol/L 磷酸盐（pH7.1）作电泳缓冲液，每一板胶用 50mA 电流电泳 16 小时。电泳后，从凝胶板上细心地取出凝胶并染色。

蛋白质的第一向凝胶分离系基于与多肽氨基酸组成有关的电荷量的差异。虽然如此，由于较大的肽移动比氨基酸组成相同的较小的肽缓慢，因此肽的分离也与分子量有关。因而凝胶板上最终所获得的图谱基本上呈对角线分布（图 7），分辨率可能低于用等电聚焦和 SDS-PAGE 所获得的结果。但是，样品中氨基酸组成彼此明显不同的多肽将分布在远离对角线的区域。

第6章　蛋白质部分水解后的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳肽图

B. David Hames

导　言

在含 SDS 的缓冲液中用聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）对蛋白质进行分级分离，是一种具有高分辨力的方法，已广泛用来研究混合样品的组成。然而，由于分级分离仅仅根据分子的大小，因此不能作出这样的推断，即由于两种多肽在 SDS-PAGE 中具有相同的泳动率，因而它们必然相关。相反，虽然是前体与产物的关系，或者是在制备过程中人为地降解的结果，两种蛋白质可能紧密相关，但却具有不同的泳动率。在各种情况下人们希望了解两种或两种以上多肽区带之间的真实关系。有各种不同的方法可用来解决这一问题(见第 1 章)，例如，氨基酸的组成分析、免疫特性及肽图。实际上，肽图被看作是蛋白质检定中一种极严格的试验标准，James 最近对此已进行了综述[1]。将经典的双向胰蛋白酶指纹法加以改进，可将这一技术应用于少量的蛋白质，而这类蛋白质通常可在分析性聚丙烯酰胺凝胶电泳后得到(参考文献[2—4])。另外，Cleveland 等[5]最近介绍了一种灵敏的鉴别蛋白质的试验，方法同样根据蛋白质的裂解，操作仅需数小时；而且能同时比较数种多肽，所需要的仪器只是标准板电泳仪。这种方法特别适用于第一向用 SDS-PAGE 分级分离的多肽肽图，同样也适用于用各种方法纯化的蛋白质。

在 Cleveland 的方法中，经 SDS-PAGE 后，通过短暂的染色和脱色，可对有关的多肽定位，然后切下有关的多肽，并将凝胶切片放置于按 SDS-不连续缓冲系统制备的聚丙烯酰胺板胶的样品池中。样品池中也加入已知数量的在 SDS 存在下仍然具有活性的特异蛋白酶。在进行第二向电泳分离时，蛋白酶消化每一多肽所产生的肽片按其分子量进行分离。肽的区带图谱反映着蛋白质底物及应用的蛋白水解酶的特征，因此通过简单地比较肽的区带图谱，可以阐明多肽之间的关系。

必须强调指出，用双向电泳法制备的肽图仍然是一种鉴别多肽极有说服力的检验试验。用 Cleveland 方法制备的单向凝胶电泳肽图的价值，在于它能迅速简便地评价数种蛋白质样品之间的关系。通常，若用这种方法获得的两种蛋白质肽图不相似，表明酶水解前的这两种蛋白质关系不密切。相反，若图谱相似，特别是当仅应用一种蛋白酶时，不能作为具有同一性的证据。幸好至少有七种具有不同特异性的蛋白酶能应用于这种方法。这就是综合利用一种蛋白酶消化，分离出肽的片段后，再用第二种蛋白酶水解，则增加了双向肽图分析方法在多肽序列比较中的说服力。本章介绍 Cleveland 程序的基本方法学及其对研究者可能有益的某些改进。

仪　　器

制备 SDS-PAGE 肽图所需要的唯一设备，是第 1 章介绍的标准板电泳仪。

方　法　学

实验步骤

若分析的多肽区带不经洗脱即进行分析，那末蛋白质混合物最初的 SDS-PAGE 分级分离应该采用板胶形式，以便凝胶片段容易安放在进行蛋白水解的第 2 向凝胶的样品池中。按照前文叙述的方法，用 SDS 不连续缓冲系统制备第一向板胶并进行电泳（第 1 章）。电泳后，板胶在 0.1% 考马斯蓝的甲醇:水:冰醋酸（5:5:1 体积比）的溶液中染色不超过 30 分钟，然后在含 5%（体积比） 甲醇的 10%（体积比）醋酸溶液中用扩散法脱色最多 60 分钟。再用水漂洗凝胶并将凝胶放置在灯箱上的半透明玻璃板上，用刀片切下待研究的多肽区带。然后适当修整切片，以便能方便地放在第二向板凝胶的样品池中，每块切片在 10ml 0.125mol/L Tris-HCl(pH6.8) 和0.1%SDS 组成的溶液中浸泡 30 分钟，并偶尔搅拌令其平衡。 Cleveland 等[5]在凝胶缓冲液中还加入 1mmol/L EDTA，但据报道一种最有应用价值的蛋白酶，金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶，活化时需要二价的阳离子，故此时不加 EDTA。浸泡后，凝胶切片可以立即使用或在 −20℃ 冰冻贮存。

按照 SDS-不连续系统制备第二向板胶，不同之处是浓缩胶的长度（高约 5cm)和分离胶（9—11cm）的长度。 分离胶的最适凝胶浓度取决于待消化的多肽及其肽产物的分子大小，15% 丙烯酰胺通常是合适的，至少在起初的研究中是如此。 应用浓度梯度凝胶也能获得良好的效果（见下文)。用 0.125mol/L Tris-HCl（pH6.8)、0.1% SDS 组成的液体充满样品池，用微型刮刀将凝胶的每一切片水平地放置在已形成的样品池的底部。凝胶切片周围的空间用含 20% 甘油的上述缓冲液(约 10—20μl) 充满，凝胶切片的表面也覆盖这种缓冲液。 最后将 10μl 含 10% 甘油、0.001% 溴酚蓝的上述缓冲液及已知量的蛋白酶加于每一样品池中。能应用的某些蛋白酶包括金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶、木瓜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、灰色链霉菌（*Streptomyces griseus*）蛋白酶、无花果蛋白酶、糜蛋白酶和弹性蛋白酶。

电泳开始时电流为 10mA，直至示踪染料到达浓缩胶的 2/3 处左右，然后将电源切断并经历一段时间。在这段起始电泳期间，蛋白酶和多肽底物同时被浓缩并进行水解。水解的程度取决于蛋白酶的类型、蛋白酶与多肽的比值以及浓缩过程的持续时间。通常，电源切断 30—40 分钟，通过改变蛋白酶与多肽的比例可以获得不同程度的降解（见下文)。蛋白质水解后，继续用 25mA 电流电泳，直至示踪染料到达分离胶的底部。按照前述方法将凝胶染色和脱色。若多肽具放射性，则按第 1 章所述方法制备用于放射自显影或荧光显影的凝胶。

图 1 和图 2 展示了典型的结果。图 1 表明不同的蛋白质(本例中为白蛋白、微管蛋白和碱性磷酸酶)用同一蛋白酶水解，或同一蛋白质用不同蛋白酶水解，所观察到的肽区带图谱的明显不同。 图 2 展示了 P23 和 P23* 肽图的比较结果。 前者（P23）为噬菌体

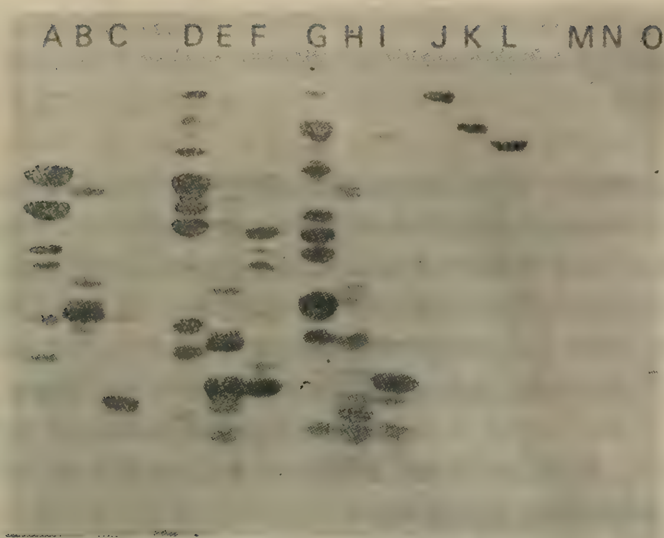


图 1　利用不同的蛋白酶所作的白蛋白、微管蛋白、碱性磷酸酶的肽图；蛋白质水解在溶液中进行。白蛋白、微管蛋白和碱性磷酸酶(浓度均为 0.67mg/ml 样品缓冲液)在 37℃ 下与下列蛋白酶保温 30 分钟，然后每种样品取 30μl 加样于 20% 聚丙烯酰胺板胶上。

A—C， 分别用 33μg/ml、3.3μg/ml、33μg/ml 木瓜蛋白酶(最终浓度)水解后，白蛋白、微管蛋白和碱性磷酸酶的肽图。

D—F， 分别用 133μg/ml、67μg/ml、67μg/ml 金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶水解后，白蛋白、微管蛋白和碱性磷酸酶的肽图。

G—I， 分别用 133μg/ml、67μg/ml、67μg/ml 糜蛋白酶水解后，白蛋白、微管蛋白和碱性磷酸酶的肽图。

J—L， 分别为 2.5μg 未水解的白蛋白、微管蛋白和碱性磷酸酶。

M—O， 分别用最大量的木瓜蛋白酶、金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶和糜蛋白酶水解。

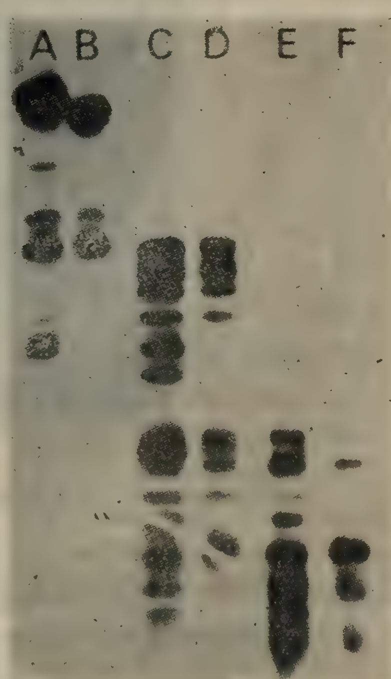


图 2　用金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶水解 P23 和 P23* 的肽图；水解是在电泳时进行。将前体蛋白 P23 从 SDS 凝胶上切下，凝胶上载有从 T4 噬菌体突变种感染的细胞中分离并用 [U-^{14}C]-亮氨酸标记的包膜组分。P23* 蛋白为 P23 加工过程中的产物，系从载有 [U-^{14}C]-亮氨酸标记的噬菌体颗粒的 SDS 凝胶上切下。将凝胶染色以便观察蛋白区带，含有 P23 和 P23* 的凝胶切片加于第二个 SDS 凝胶 (15% 丙烯酰胺)中，同时加入金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶。在浓缩过程中进行水解(见实验方法)。用荧光显影法检测肽。

A 和 B 分别为用 0.005μg 酶水解所获得的 P23、P23* 图谱。

C 和 D 分别为用 0.025μg 酶水解所获得的 P23、P23* 图谱。

E 和 F 分别为用 0.5μg 酶水解产生的 P23、P23* 图谱。

(经允许从参考文献[5]中复制。)

T4 头部蛋白质 P23* 的前体，它含有一个额外的N末端氨基酸序列。如所预期的那样，大量的肽是共同的，但某些附加序列的肽则不相同。

实施要点

(i) 若多肽在柱胶上分离，则在样品加于板胶上进行肽的分级分离之前应先将蛋白区带洗脱和水解。稍加染色和脱色后，将区带从柱胶上切割下来，用电泳法洗脱（见第1章），或在诸如含 0.1% SDS 的 0.05mol/L 磷酸缓冲液（pH7.5）中，37℃ 下混合保温过夜行扩散洗脱。用离心法除去凝胶碎片。多肽用冰冻的 TCA 保温沉淀，用乙醇-乙醚（1:1）洗 2 次后，再以 0.5mg/ml 的浓度溶解于 0.125mol/L Tris-HCl（pH6.8）、0.5%SDS、10% 甘油和 0.001% 溴酚蓝组成的溶液中。样品在 100℃ 加热 2 分钟，冷却并加入一定量的蛋白酶，于 37℃ 下水解 30 分钟。然后加入 SDS 和 2-巯基乙醇使其最终浓度分别达到 2% 和 10%，再在 100℃ 下加热 2 分钟终止蛋白质的水解，取 20—30μl（10—15μg）加于板胶的样品池中作肽的分级分离。

(ii) 溶液中已纯化的蛋白质也用 TCA 沉淀，以除去样品中的缓冲离子或能干扰随后电泳的其它污染物。然后按上述 (i) 所述的步骤进行水解。

(iii) 对于非放射性标记的蛋白质肽图而言，起始区带中每一多肽最少需要 10μg，以便易于用考马斯蓝染色观察多肽。用这一数量的多肽可以观察到的肽数目可达 20 种。对于放射性标记的蛋白质，所需要的多肽数量通常要少得多，并且只受蛋白质的比放射性及所应用的检测系统的灵敏度限制。标记蛋白质可以在体内或体外用标记氨基酸前体，通常为 [^{3}H]-亮氨酸或 [^{35}S]-甲硫氨酸的方法合成，并用荧光显影（第 1 章）测定。然而，多肽混合物也可以在电泳前或从起始的凝胶切片上将多肽洗脱后[2,3]，用氯胺 T 作放射性碘标记[6]。聚丙烯酰胺凝胶电泳后，蛋白质放射性碘标记的最新方法甚至不需将蛋白质从

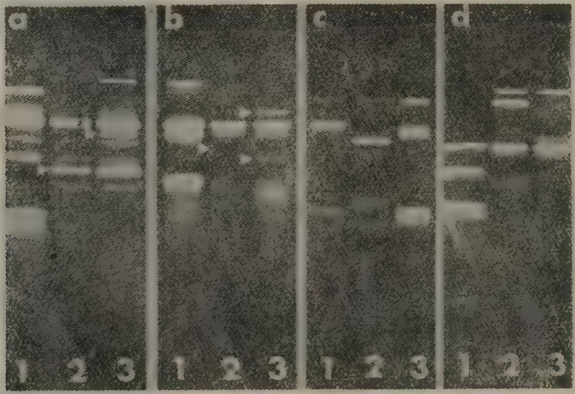


图3　从丹磺酰化的蛋白质所获得的肽图。

a，密核病（densonucleosis）病毒结构蛋白 1.p49，2.p59，3.p69 用金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶水解后的肽图。

b，用木瓜蛋白酶作蛋白酶对上述三种病毒蛋白水解后的肽图。

c 和 d 分别为无关的醛缩酶和卵清蛋白的肽图，系用：1. α-糜蛋白酶，2.金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶，3.木瓜蛋白酶水解。

三种病毒蛋白肽图明显相似，表明它们具有共同序列；箭头表明在蛋白质水解中产生的具有较高分子量的额外的蛋白区带。两种无关的蛋白质，醛缩酶和卵清蛋白，产生的肽图彼此无关。

（经允许从参考文献[8]复制。）

凝胶上洗脱下来[4,7]。体外标记蛋白质的各种详尽方法可参阅附录 II。

第二种用来提高肽检测灵敏度的方法，是将多肽与丹磺酰氯反应[8]。然后可以象通常一样将丹磺酰化的多肽水解，再用紫外线荧光检测肽的产物。据认为检测灵敏度比考马斯蓝染色法高 4—8 倍。图 3 展示了应用这种技术进行分析的典型结果。

(iv) 虽然可以通过调节浓缩的时间或蛋白酶与多肽的比例而改变水解的程度，但是一种便利的方法是保持浓缩时间恒定并加入数分待比较的多肽样品，每分样品中多肽数量恒定但蛋白酶的用量不同(如图 2)。这种方法使研究者有可能选择最适的酶浓度，它能产生分子量范围宽的片段，但起初的蛋白质最多只留下一条模糊不清的区带。在许多实例中，蛋白酶浓度的改变达 10 倍以上时，也未观察到肽图有明显的变化，但是当肽图发生了改变，这种改变在蛋白水解类型方面能提供更多的信息。一旦确定了合适的蛋白酶浓度，每一多肽可用一系列不同的蛋白酶水解(如图 1)。

若最适水解所需要的蛋白酶浓度高于考马斯蓝染色测定的最低值，那么凝胶染色后蛋白酶区带也清晰。为了避免混淆，电泳一分仅含蛋白酶的样品总是有价值的(图 1)。若采用放射性多肽，并用放射自显影或荧光显影检测，则不论蛋白酶浓度多高均不能测得蛋白酶。

(v) 按照 Cleveland 最初的方法，肽的分离胶是采用均一浓度的板胶。实际上，若采用浓度梯度凝胶，可以得到清晰得多的肽区带(图 4)。已应用各种浓度梯度凝胶，但 5—20% 或 10—25% 线性梯度丙烯酰胺似乎是适宜的，这取决于原始多肽及水解后的片段大小。梯度板胶的制备见第 1 章。

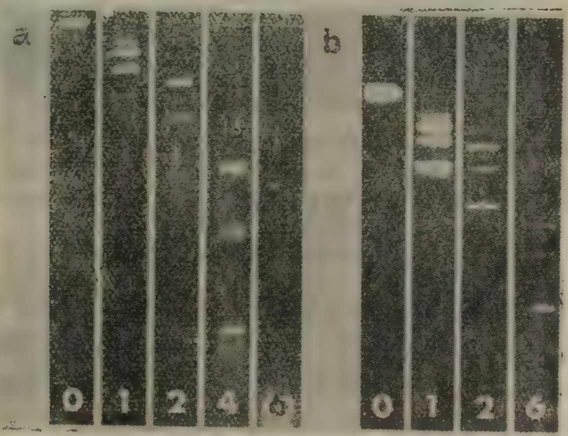


图 4 应用聚丙烯酰胺梯度凝胶增加肽区带的清晰度。用 (a) 均一的丙烯酰胺凝胶 (15% 丙烯酰胺，2.66% 双丙烯酰胺)或 (b) 梯度凝胶 (10—20% 丙烯酰胺，5% 双丙烯酰胺) 分离 P49 的水解产物。图中数字为 P49 水解物进入分离胶后以小时计算的电泳时间。
(经允许从参考文献[8]复制。)

基本技术的改进

非均一性蛋白质样品的肽图

Cleveland 等[5]用来比较两种或两种以上纯化多肽的基本方法适用于不均一性蛋白质混合物中各成分的分析，而不必将各成分逐一纯化[9]。混合物中的蛋白质按常规用 SDS-PAGE 作第一向分离，然后将含有已分级分离多肽的整个凝胶条转移至第二向板胶上。各

多肽在凝胶中进行部分水解，然后在与第一向凝胶呈垂直的方向进行第二向凝胶电泳，结果每一多肽的产物呈一系列斑点，分布于未水解的多肽起始位置之下。

蛋白质混合物的第一向分离用 SDS-PAGE，板胶厚 1.5mm，缓冲液为 SDS 不连续缓冲系统。电泳结束后，将含有样品组分已分离的凝胶条切割下来，室温下在 50ml 0.125mol/L Tris-HCl(pH6.8)，0.1% SDS 组成的缓冲液中，平衡 40 分钟并缓慢搅动。第二向板胶厚 1.8mm（以便易于转移凝胶条作第二向电泳），其分离胶浓度为均一的 15% 丙烯酰胺，虽然应用浓度梯度凝胶能获得更好的结果。灌注第二向板胶的浓缩胶不用样品梳制备样品池；而是用一层水覆盖，以便在聚合后获得一平整的弯月面。

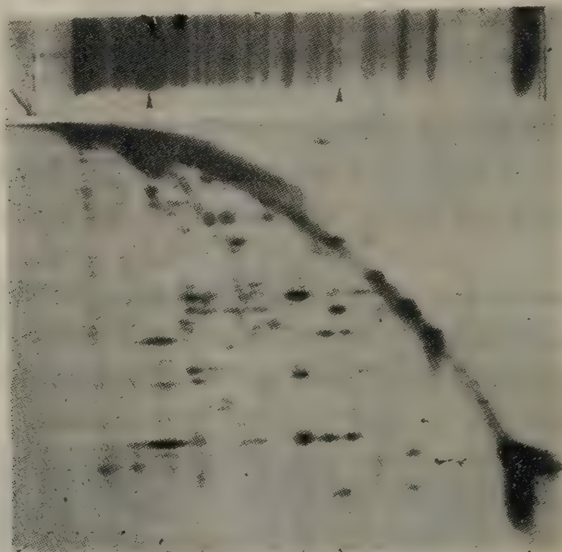


图 5　非均一蛋白质样品的肽图。人红细胞膜（100μg 蛋白质）在 4—13% 线性梯度板胶上电泳，然后将含有样品的凝胶条转移到均一浓度的丙烯酰胺凝胶（15% 丙烯酰胺）上，用含有 1μg 金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶的样品缓冲液覆盖。同一样品（50μg）单向电泳后的染色电泳图谱展现在双向凝胶的上部。
（经允许从参考文献[9]复制。）

临近第一向电泳后的凝胶条转移之前，在烘箱上将第二向板胶预热至 50℃。同时制备一分含 0.125mol/L Tris-HCl(pH6.8) 和 0.1%SDS 的 1% 琼脂糖溶液，于 56℃ 下保持熔化状态。当凝胶条充分平衡后，从烘箱取出板胶，倾去覆盖的水层，浓缩胶的上部迅速用少量 1% 琼脂糖热液体冲洗。再加入 1% 琼脂糖的热液体，将第一向凝胶条放置在板胶的玻璃板之间，迅速将凝胶条放平且与浓缩胶紧密相接。若欲使凝胶条的顶部平整，需加入更多的琼脂糖。待琼脂糖凝固后，即将凝胶放置在电泳仪中，用适宜于 SDS-不连续缓冲系统的电极槽缓冲液注满电极槽。然后将选定的蛋白酶溶解在 1ml 由 0.125mol/L Tris-HCl (pH6.8)、0.1%SDS、10% 甘油、0.001% 溴酚蓝组成的溶液中并加到琼脂糖凝胶的表面上。为了使蛋白酶与多肽共同浓缩，在 4—10mA 条件下电泳一段时间，然后切断电源根据需要让蛋白质水解一段时间。早期的作者采用 0.4—25μg 的金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶，浓缩时间为 1.5—7 小时。蛋白质水解后，在 25mA 电流下经历数小时或在 4mA 电流下过夜完成电泳。凝胶按前述方法染色和脱色。

以红细胞膜为例，经第一向 SDS-PAGE 后可观察到大约 30 条区带，并能产生约 20

种不同的肽区带图谱（图5）。从图5左上方延伸到右下方呈对角线的斑点是由样品中尚未水解的多肽形成。这种方法的优点之一，是能使研究者检测出以前未曾预料到的多肽之间存在的相同的序列，这是由于这一肽图显示出相似的斑点图谱（如图5中箭头所示的二条区带）。然而必须时刻记住的是，应用这些方法中的任一种时，均假定所研究的多肽区带为单一组分。若情况不是这样而是在所利用的电泳条件下，区带是由泳动率刚好相一致的不均一的组分组成，这类方法产生的肽区带图谱将导致错误的结论。

资料的解释

Calvert 和 Gratzer[10] 提出了一种用 Cleveland 肽图法来定量表达蛋白质相似程度的方法。从电泳的分辨率考虑，将凝胶含肽区带图谱的某一部分与N个连续的相等部分进行比较，这些相等的凝胶可能含肽区带，也可能不含肽区带。在比较二种图谱类型时，m为一种图谱中的某一区带，n则为另一图谱中的区带，它们均分布在N分的部分中，区带发生一致的几率(x)以下式表示：

$$P(x)=\frac{m!n!(N-m)!(N-n)!}{N!x!(m-x)!(n-x)!\,(N-m-n+x)!}$$

因此，若x足够大，$P(x)$则很小，即区带的一致性完全不可能是由于区带的偶然巧合所产生的，所以蛋白质的序列确实是类似的。

例如，比较二种收缩蛋白亚基，经木瓜蛋白酶水解[10]后的肽区带图谱表明：

$N=140$(7cm 凝胶上最大的区带数，分辨率 0.5mm)

$$m=23$$

$$n=20$$

$x=11$（外观泳动率相等的区带数）

因此，

$$P(x)=1\times10^{-5}。$$

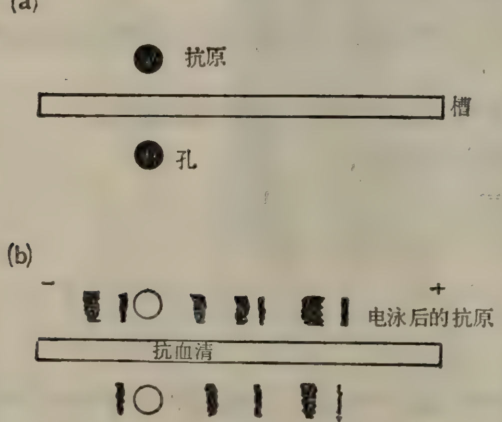
因此，不存在由于偶然因素而造成区带相一致的可能性。确切的相关性通常的标准是 $P(x)<0.01$。

第7章 免疫电泳

Richard D. Jurd

引　　言

免疫电泳是利用电场作用下带电蛋白质在凝胶中具有不同的泳动率，以及相同的蛋白质具有完整的抗原性的特点。实际上，蛋白质（或蛋白质混合物）是在琼脂或琼脂糖凝胶中电泳。在凝胶中刻一槽，其方向与电场相平行，同时与蛋白质泳动的路线相距几毫米(图 1)。电泳后，将抗电泳蛋白质的抗体吸入槽内。抗体扩散至凝胶中，并与电泳蛋白质形成不溶性抗体/抗原复合物。人们能借助沉淀弧线来观察这类复合物(图 2)。沉淀弧线具有特殊的形状、图象，并且离开加入抗原的部位和(或)槽一段距离。



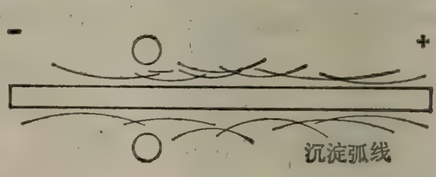


图 1　免疫电泳的原理。
(a) 抗原放置在凝胶上的小孔中。
(b) 抗原在电场中电泳；抗血清放置在凝胶上的小槽内，并扩散到凝胶中与电泳抗原相遇。

图 2　由不溶性抗原-抗体复合物形成的免疫电泳弧线。

这类技术可用于：

(i) 检查蛋白质制剂的纯度；

(ii) 分析蛋白质混合物的组分；

(iii) 研究抗血清制剂中是否具有抗某种已知抗原的抗体；

(iv) 检验两种抗原是否相同。

免疫电泳特别适用于检定血清蛋白质的特性，此外还有其它多种用途。Roitt[1] 从免疫学观点阐明了免疫电泳的有关理论概念；Weir 对这一领域作了更为充分的探讨[2]。

对免疫电泳的基本技术已进行了改进，并逐步发展成能进行定量的方法。这种技术，其中包括火箭免疫电泳和双向(交叉)免疫电泳，简要概述如下。

抗原和抗体的制备

抗原

抗原是能引起一种免疫反应的任一物质。通常的抗原是外来的组织移植物、病原性微生物和诸如脂多糖和蛋白质之类的大分子。若将蛋白质注射到脊椎动物体内，为了能产生抗这种蛋白质的抗体，动物必须能识别这种“非自身”所有的蛋白质。脊椎动物特有的免疫应答高度的特异性意味着，兔或鼠能识别诸如牛血清白蛋白之类的蛋白质为非自身的蛋白质，并诱发抗体的合成。相似蛋白质上的相似抗原决定簇可能意味着一种蛋白质可能与另一种蛋白质产生“交叉反应”。这种交叉反应性常常能用干扰交叉反应的蛋白质“吸收”抗体制剂的方法消除。

抗体的产生

抗体通常用新西兰或荷兰兔来制备，当需要较大量体积的血清时，常使用绵羊和山羊。

用作免疫原的抗原应尽可能纯，因为制备纯抗原通常比从一个抗血清制剂中除去不需要的交叉反应更容易。免疫程序变化很大，对于某一具体的抗原，理想的免疫程序需通过实验发现。作者发现下列程序通常是可靠的。

免疫当天　体重 3kg 的家兔注射 1ml 含 0.1—5.0mg 抗原蛋白的溶液，该溶液由 0.14mol/L NaCl 和 pH 7.3，0.02 mol/L磷酸钠缓冲液组成(磷酸缓冲的盐溶液)，注射前与 1ml 完全弗氏佐剂乳化成总体积为 2ml 的乳状液。为了使蛋白质溶液与完全弗氏佐剂充分乳化，将全部组分抽进一支装有 19 号针头的 2ml 玻璃皮下注射器中，再从中推出直至形成一种粘稠的白色乳状液为止。将一滴乳状液滴入冰水中以检查乳状液的稳定性，第二滴和第三滴应当漂浮在水面上而不弥散。乳状液在兔的上肢和后肢作皮下注射，每一部位为 0.5ml (图 3)。妥当的方法是同时对两只兔进行免疫，或者在一只兔免



图 3　在兔前肢的上部进行注射的方法。将兔放在毛巾上以左手固定。

疫一周后再免疫另一只兔。

数量较少的高纯度抗原(低至 50μg 蛋白质)可以用来产生单一特异性抗体。数量甚至更少的抗原可以分散在免疫吸附剂微晶纤维素上；已经成功地利用 1μg 的蛋白质[3]。也可以应用在聚丙烯酰胺凝胶上分离的蛋白质,这时聚丙烯酰胺起着辅助佐剂的作用。用等渗盐水将含蛋白质的凝胶匀浆,然后在注射前用完全弗氏佐剂乳化。

免疫后第 28 天　　第 2 次追加注射蛋白质抗原的方法,除以不完全弗氏佐剂代替完全弗氏佐剂外，其它与免疫当天相同，注射在肩胛骨之间和骶骨之上臀部之间的皮下部位;每一部位注射 1ml。

追加注射时也可以注射"铝沉淀"(alum-precipitated) 的蛋白质抗原。含量达 2mg/ml 蛋白质的蛋白质溶液,与 1/2 体积 1mol/L $NaHCO_3$ 混合,随后加入 1 体积 0.2mol/L 硫酸铝钾溶液。蛋白质即吸附在生成的氢氧化铝沉淀上。缓慢搅拌混合物并放置 30 分钟。300 × g离心 15 分钟使沉淀成团,用磷酸缓冲的生理盐水洗涤三次。沉淀悬浮于 2ml 磷酸缓冲的生理盐水中,于臀部和肩部肌内行肌肉注射,每点 0.5ml。

免疫后第 35 天　　将兔放在台上,用一块大布包住，仅让一只耳朵和头顶露出。轻轻揉搓耳朵，刮去耳廓背部边沿上的软毛。在边沿耳静脉上纵向切一长约 0.2cm 的切口。从切口滴出的静脉血收集在一只 100ml 玻璃烧杯内 (图 4)。用这种方法大约可收集 25ml 血液。在一间安静而温暖的室内，用手拍兔使其安静并在兔耳上方约 20cm 处用一只台灯将兔耳加温,可以增加血流流速。若血流停顿,可以用一块柔软的纱布轻轻擦拭

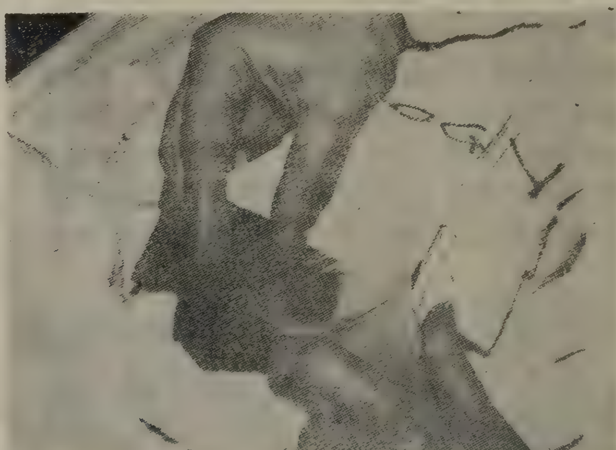


图 4　从兔耳廓边沿静脉放血。用布或毛巾将兔包住。用右手将兔耳固定在小烧杯的上部。

切口,使血流恢复。结束时,用一团棉花紧压伤口 30 秒即可止血。

免疫后第 42 天　　与第 35 天一样,可再次取血 25ml。

若需用更多的抗血清,可按免疫后第 28 天应用的方法,再次对兔行抗原注射,并在注射后第 7 天和第14天放血。

轻轻搅动血块以防止血块粘着在烧杯壁上；然后在约 2 ℃冰箱中放置过夜。次日从略有皱缩的血块中吸出淡黄色的血清,并以 1,500×g 离心 15 分钟。上清液分成 1ml一分,贮于−10℃。

抗血清商品

可选用许多常用抗原高滴度及高特异性的抗血清商品制剂。下列公司的编目表值得查阅,尽管所列举的公司可能有遗漏:

Gibco Biocult Ltd.
Miles Laboratories Ltd.
Nordic Immunological Laboratories Ltd.
Wellcome Reagents Ltd.

抗体活性分析

用简单的免疫扩散即能检查抗体活性。用2号打孔器(直径约0.5cm)或Pasteur吸管粗的一端,在装于培养皿的1%琼脂凝胶(含0.02%叠氮钠)上,按图5所示的图型打出一系列样品小孔。凝胶应厚约0.2cm。将系统稀释(1:1,1:2,1:4,1:8等)的抗血清置于外周一系列的小孔中。浓度为1mg/ml的抗原置于中央小孔。将板盖住,在潮湿环境下放置48小时。在抗原和抗体小孔之间出现白色沉淀线时,表明血清中有抗体活性。以48小时后显示可见沉淀线的抗血清最大稀释度定为抗血清的"滴度"[4]。

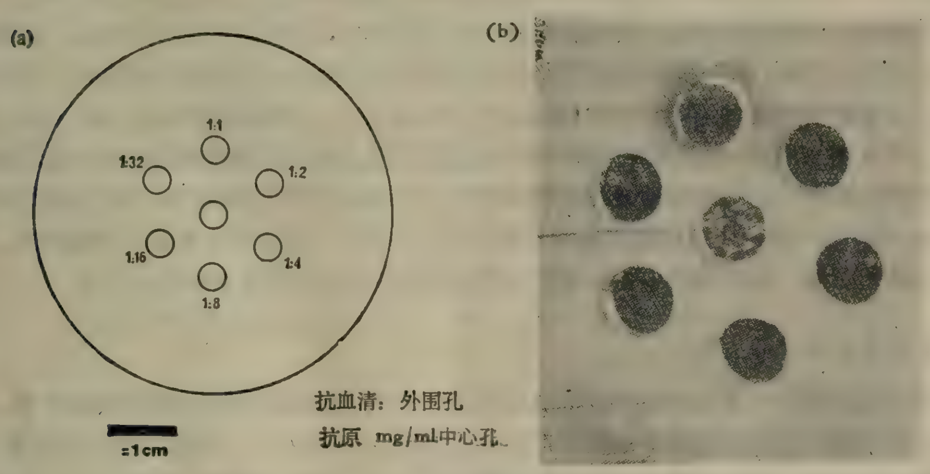


图5 免疫扩散板。

(a) 刻在琼脂凝胶上的小孔格式及抗血清的稀释度。

(b) 免疫扩散板。中心孔含抗原鲎血蓝蛋白(*Limulus* haemocyanin),浓度为1mg/ml。四周小孔内含鲎血蓝蛋白的抗血清,其稀释度从上部开始按顺时针方向分别为1:1,1:4,1:16,1:64,1:256,1:1024。

IgG 抗体的纯化

免疫电泳研究中最有用的抗体是免疫球蛋白中的各种IgG。从兔血清中制备IgG部分通常是有益的,因为抗血清中IgM抗体的存在,在免疫电泳的凝胶中能产生第二条(IgM-抗原复合物)沉淀线,使沉淀图型的分析更困难。

血清(100ml)与60ml含0.02mol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA(pH 8.0)的饱和硫酸铵溶液混合,室温下放置30分钟,在4,000×g条件下离心45分钟,沉淀再溶于

40ml 同一缓冲液中。再用硫酸铵沉淀(用 24ml 盐溶液),直至沉淀变成白色。最后将沉淀溶于 20 ml 0.005mol/L 磷酸钠 (pH 8.0) 中,溶液对该缓冲液透析。

IgG 粗制品溶液用 DEAE-纤维素离子交换柱层析进一步纯化。所用的 Whatman DEAE-纤维素 (DE52) (W. 和 R. Balston Ltd) 与蛋白质溶液的比例为 3g/ml,并加入 0.5mol/L NaH_2PO_4 直至溶液达 pH8.0,溶液用 0.005mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 8.0) 稀释,每 5ml 缓冲液约需 1 克湿纤维素。搅拌匀浆并令其沉积 30 分钟,以便形成 10cm 高的柱床。弃去上层清液,再加入 1/2 体积的 0.005mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 8.0) 并充分搅拌。匀浆灌注人一短而粗并有一个放液口的柱中(直径约为高度的 1/5),将 0.005 mol/L 磷酸钠 (pH8.0) 泵入柱中,流量为 60ml/时/cm^2 柱内截面积。一般洗一只 15cm × 3cm 的柱子应当用 5L 缓冲液。

将透析过的蛋白质制剂加于柱的顶端。装在梯度混合器的混合室中的起始缓冲液 (0.005mol/L 磷酸钠, pH8.0) 以 60ml/时的流量泵入,并监测洗脱样品中的蛋白含量。第二室中盛有 0.25mol/L 磷酸钠 (pH 8.0),它随后逐渐加到盛在梯度混合器混合室中的起始缓冲液内,以形成离子强度梯度(其形态应为凸形梯度)。洗脱下的第一个蛋白峰含有 IgG。洗脱液可用超滤,例如,用装有 PM 10 滤膜的 Amicon 装置浓缩。

IgG 进一步用 Sephadex G-200 (Pharmacia Ltd) 凝胶层析纯化。约 20g (干重) Sephadex G-200 在 0.14mol/L NaCl、0.02mol/L 磷酸钠 (pH7.3) 组成的溶液中,于沸水浴加热约 6 小时令其膨胀。待膨胀凝胶冷却,即在与真空泵相连接的 Buchner 滤瓶中搅拌下脱气 5 分钟;这一操作除去了能使蛋白质区带洗脱异常的气泡。凝胶沿一支玻璃棒灌注入处于垂直状态的层析柱 (100cm × 2.6cm) 中。全部凝胶匀浆必须一次注入柱内。打开柱底部流出口,让凝胶在数小时内沉积。用 3 倍体积磷酸缓冲的生理盐水流过层析柱使柱填充。应当用蠕动泵将流量维持在 15—25ml/时。将 7.5ml IgG 制剂(浓度约 2mg/ml) 加于柱上,然后将流量调节至 15—25ml/时,用分部收集器收集洗脱液,每分洗脱液为 3ml。分析样品中蛋白质的浓度,洗脱的第 2 峰内含 IgG。

不需要的抗体活性的去除

用与抗原有关的蛋白质在含有抗血清或 IgG 制剂的琼脂糖凝胶上进行免疫扩散,能显示出由于享有共同的抗原决定簇而产生的不需要的交叉反应。例如,由于蛋白质 X,蛋白质 Y 和 Z 都具有共同的抗原决定簇,因此,蛋白质 X 的抗血清能与蛋白质 Y 和 Z 发生交叉反应。吸附作用能除去这类交叉反应。以上述蛋白为例,抗 X 的抗体能够与蛋白质 Y 和 Z 混合(准确数量由实验确定),于 4 ℃下存放过夜。次晨将混合物在 5,000×g 下离心30分钟,以除去抗原-抗体复合物。可以用免疫扩散检查上清液中是否仍然存留有抗 Y 或抗 Z 的抗体活性。为了完全去除不需要的抗体活性,所需要的 Y 和 Z 蛋白的最低值可以通过实验来确定。

简易免疫电泳

仪器

电泳槽(图 6)

电源组

伏特计

小孔打孔器——Pasteur 吸管或打孔器商品(见下文)

切开凝胶用的工具——刀片和直尺或市售装置(见下文)

打孔及切成纵条用的模板

显微镜载玻片（7.5cm × 2.5cm）

配备有酒精水准器的水平台

水浴锅

微量注射器（Hamilton Bonaduz AG）

组织染色缸和载片台

磁力搅拌器及有关部件

试剂

纯琼脂或其它琼脂糖。

巴比妥电泳缓冲液[5]

按下列配方制备 1L 缓冲液（pH8.2）:

5,5′-二乙基巴比妥酸钠盐：12g 溶于 800ml 水中

5,5′-二乙基巴比妥酸：4.4g 溶于 150ml 水中 5,5′-二乙基巴比妥酸需加热至 95℃ 使其溶解

将二溶液混合，用 5mol/L NaOH 调节 pH 至 8.2，加入 0.15g 硫柳汞（thiomersal）后，将体积调至 1L。注意这种缓冲液有毒！

磷酸缓冲的生理盐水溶液（pH 7.3）

染色液

胺黑或考马斯蓝 R-250	0.1g
5%(体积/体积)醋酸水溶液	100ml
或	
偶氮胭脂红（azocarmine）	1g
1mol/L 醋酸	450ml
0.1mol/L 醋酸钠	450ml
甘油	100ml

脱色液

5%(体积/体积)醋酸水溶液

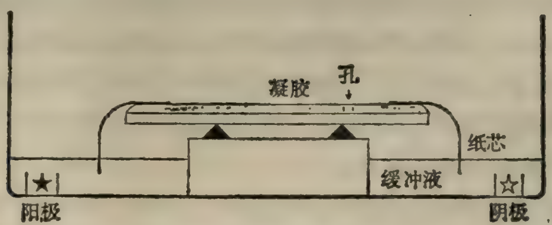


图 6　免疫电泳槽的横截面图。

方法

琼脂或琼脂糖均能用于免疫电泳，二者都能应用于这一方法中。然而，琼脂糖价格较贵，其结果并不优于价格较低廉的琼脂。将 2g 左右的琼脂与 98ml 巴比妥电泳缓冲液[5]在沸水浴中加热。

用乙醇将载玻片洗净并用玻璃刀标出阳极及所用的抗原和抗体，将载玻片置于水平台或其它的水平面上。

所有载玻片都预先用熔化的琼脂在其表面涂一层膜，载片恰好为琼脂覆盖。待琼脂凝固并干燥。这一步骤使琼脂具有粘附玻片的作用，从而防止在洗涤时琼脂凝胶漂离。

然后将 3.5ml 熔化的琼脂轻轻吸到预先已涂布琼脂的载玻片上，静置，直至琼脂冷却凝固。按图 7 所示，用一支 Pasteur 吸管的尖端在琼脂上打孔；将孔内的琼脂吸出。根据蛋白质抗原的性质，小孔可位于中央或周围。电泳血清的蛋白质时，小孔通常位于载玻片上邻近阴极端的部位。用解剖刀或单刃刮刀刻一槽，在电泳完成后才将槽中琼脂条除去。已有成套的专门用来开槽和打孔的模具商品，以满足经常应用这一方法的工作者的需要。其详细内容见下文。

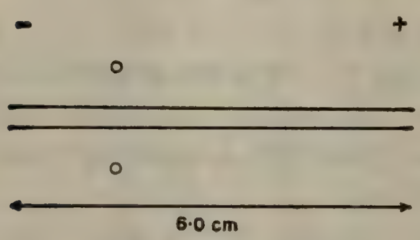


图 7　在免疫电泳载玻片上切胶的方式。

用 50μl Hamilton 精密注射器取 2μl 蛋白质-巴比妥缓冲液样品（浓度为 1mg/ml）加于小孔（样品池）中。将载玻片横放在电泳槽的桥上（图 6），用巴比妥缓冲液将装有电极的贮液槽注满。并用缓冲液将切成与载玻片等宽的滤纸芯润湿，悬挂在琼脂凝胶的末端，盖住 0.5cm 凝胶，滤纸芯的游离端则下垂到贮液槽中。可平行电泳数块载玻片。

盖住电泳槽，电极与能提供恒定直流电流的电源相连接。每一块载玻片供 10mA 左右电流，其电压约 6V/cm。最适电泳时间由实验确定。然而，对于血清蛋白而言，已发现由于溴酚蓝能与快速移动的白蛋白组分相结合而能监测这种蛋白质的移动状况，因此，加入极少量的 1% 溴酚蓝即可以作为有效的标志物。电泳时间常为 20—80 分钟。

电泳后，从电泳槽中取出载玻片，挖出槽中的琼脂，将约 0.1ml 抗血清（或含 IgG 的抗体制剂）注入槽中。然后在湿润的环境中室温下放置 48 小时“展谱”，随后观察沉淀弧线。

永久性免疫电泳板很容易制成。反复用 1 升磷酸盐缓冲的生理盐水搅拌洗涤 2 小时，然后用蒸馏水洗 2 次可将载玻片上未沉淀的蛋白质除去。凝胶在 37℃ 温箱中干燥过夜。干燥后，用胺黑将弧线染成蓝黑色或用考马斯蓝 R-250 染成品蓝色。染色的凝胶板在染料液中放置 10 分钟，然后在5%醋酸溶液中反复浸洗以除去游离的染料。此外，用偶氮胭脂红可以将弧线染成深红色[6]。除染色应当为 3 小时以及每次醋酸浸洗应为 1 小时外，其它操作步骤与胺黑染色步骤相同。用偶氮胭脂红染色并经干燥的载玻片在照片放大器可以直接作为“负片”拍照(图 8)。

有许多商品性的免疫电泳药箱及其附件。本文对 Gelman Hawkesley 和 Shandon Southern 的目录甚感兴趣。Millipore Ltd 制作了极灵巧、小规格的“Immunoagaroslide”免

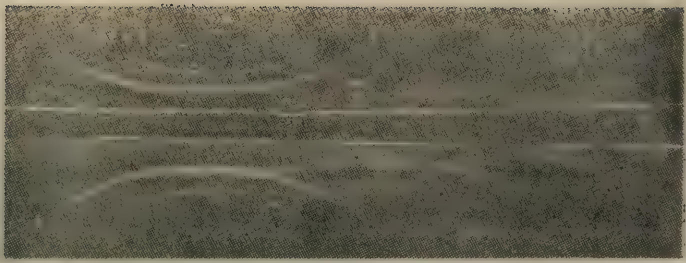


图 8 载玻片直接放在照片放大器的底片架上摄制的载玻片免疫电泳图。图中为已进行电泳的非洲爪蛙血清与兔抗爪蛙血清抗体的反应。阳极在右侧。

疫电泳系统，系将预先切好的琼脂糖凝胶固着在醋酸纤维素纸板上并包在锡箔袋中。在一种专门设计的电泳槽中能同时在二块“Immunoagaroslides”板上分析 8 种抗原样品（图 9）。

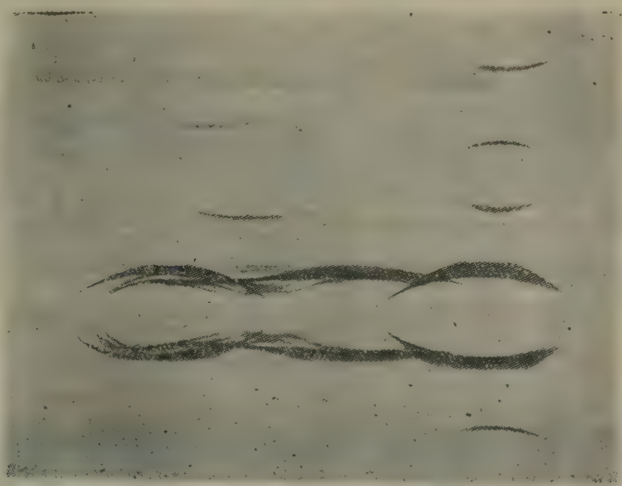


图 9 Millipore “Immunoagaroslide” 系统的载玻片。平行电泳四种抗原制剂：从上至下：非洲爪蛙胆汁，爪蛙内脏液，爪蛙血清，爪蛙胆汁。三条平行槽中的抗体均为兔抗爪蛙血清制剂。

除蛋白质染色法外，其它检测方法包括 (a) 放射免疫电泳（一种用放射性碘标记蛋白质的自显影技术）和 (b) 酶活性试验。

放射免疫电泳

利用这种改进的基本免疫电泳系统可以检测少量抗原，这对于鉴别蛋白质中的微量组分特别有用。方法中涉及蛋白质混合物的放射性碘化作用，然后用放射自显影技术检测免疫沉淀，它远比上述简单的染色法灵敏。放射免疫电泳的一个范例是在个体发生过程中对新蛋白质(如成人血红蛋白)出现的研究。按下文述及的方法将胎儿血红蛋白制剂碘化。碘化后的蛋白质与不含放射性的成年人血红蛋白及作为载体的胎儿血红蛋白混合，将制剂电泳。电泳后的蛋白质与抗成年人的和抗胎儿的血红蛋白抗血清反应，并对干燥、染色后的载玻片进行放射自显影。若观察到成年人血红蛋白沉淀弧线上有银颗粒，则表明胎儿血中存在着成年人血红蛋白。这一技术比仅仅观察弧线的方法更灵敏。技术的

另一实例可参见 Jurd 等的资料[7]。

用 Hunter 和 Greenwood 的氯胺T法[8]以 ^{125}I 将蛋白质(约 0.1mg) 碘化。碘化的蛋白质通过一支预先以不含放射性的（"冷的"）待研究蛋白质饱和的 Sephadex G-25 柱(20cm × 2.2cm)，以除去游离的 ^{125}I。用 γ 放射计数器测量洗脱样品中的放射性。收集放射性蛋白质样品并超滤浓缩。若样品中放射性碘标记的蛋白质数量很少，建议将它们与不含放射性的载体蛋白质相混合。将制剂电泳并与抗体反应。

经干燥、染色的免疫电泳板浸入 45℃ 用等量水稀释的 Ilford K5 核乳液中，以便涂上核乳液。用 Kodak D196 显影剂显影及固定前，将载玻片干燥并在 4℃ 下于暗盒中放置 10 天。显微镜下用 10 倍目镜和 10 倍、40 倍或 100 倍物镜在油膜下观察载玻片（图 10)。

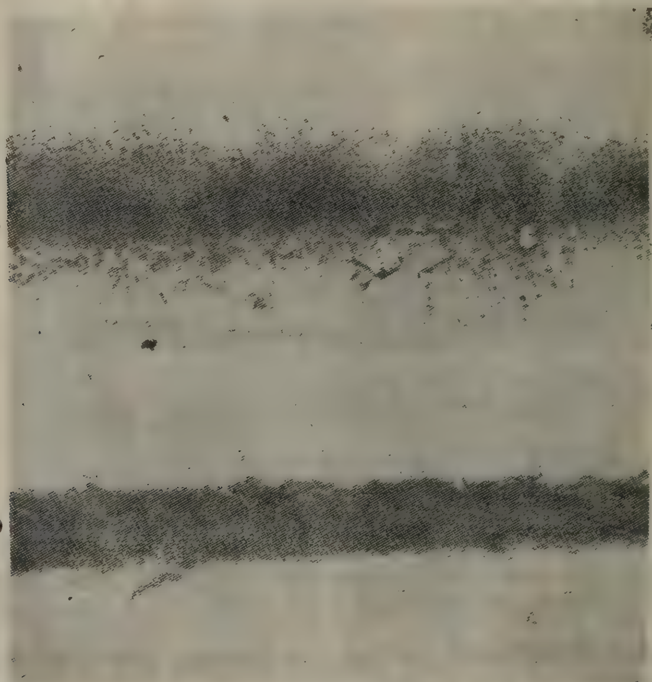


图 10　放射免疫电泳。(a) ^{125}I 标记蛋白质的放射自显影，其沉淀线上显现有银颗粒。蛋白质为 ^{125}I 标记的非洲爪蛙蝌蚪的 IgM。(b) 以成年非洲爪蛙的白蛋白作为载体与兔抗爪蛙血清的抗体反应，其沉淀弧线上无银颗粒的放射自显影。(放大 20 倍，详细内容参见参考文献[7])。

酶 检 测 法

酶活性是检测某些少量抗原的另一灵敏方法。某些酶抗原，甚至在免疫电泳板上与抗体形成复合物时，也能与其基质反应。在适当的指示剂存在的条件下，将沉淀线染色，可以使弧线更清晰。例如，在黄嘌呤（基质）和 2-(对-碘苯基)-3（对-硝苯基)-5-苯基四唑（鎓）氯化物 [2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride]（指示剂)[9]存在下，黄嘌呤脱氢酶与抗黄嘌呤脱氢酶的沉淀线染成粉红色。其它适用的活性染料可参见本书附录 I。

免疫电泳法的其它改进

对流电泳

本法系利用在 pH 8.2 电泳时，γ-球蛋白(它包含大多数抗体)朝阴极移动，而大多数其它蛋白质朝阳极移动这一事实。因此，抗体及抗原彼此相向移动，形成抗体-抗原复合物沉淀线。由于电场加速蛋白质的移动，因此，这一技术比直接免疫扩散法能更快地获得结果。

琼脂凝胶板的制备与免疫电泳法相同，样品孔的位置见图 11 。将抗体、抗原分别置于靠近阳极和阴极的小孔中。电泳蛋白质并在 15 分钟内检查；若已形成抗体-抗原复合物，应能观察到沉淀线或弧线。

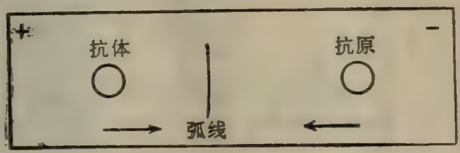


图 11　对流免疫电泳原理。

"火箭"免疫电泳

本法是免疫电泳的改进，以便对抗原浓度进行定量。在含有抗体的琼脂中，大多数蛋白质抗原在电场作用下移向阳极。抗体蛋白质则向阴极移动（与对流电泳类似)。当抗体与抗原相遇时，它们将形成抗体-抗原复合物。抗体或抗原过量时，这类复合物溶解，但接近等价点（equivalence point）时，形成的复合物沉淀具有"火箭"形状。若有更多的抗原到达火箭，沉淀即再溶解，并进一步向阳极移动。最后，当不再有更多的抗原来维持迁移时，火箭即变为固定不变。火箭下部的凝胶区与抗原浓度成正比。应用从兔抗血清中制备的单一特异性 IgG，可以避免火箭上出现多条沉淀线。

将琼脂(2%)巴比妥缓冲溶液（pH 8.2）融溶，冷至 56℃。在试管中用磷酸盐缓冲的生理盐水将抗血清稀释 5 倍并加温至 56℃。 取 2ml 热琼脂与 1ml 稀释的抗血清混合物注入已预先涂布过的显微镜载玻片上(见免疫电泳一节)，保持玻片水平并使其凝结。在玻片一端打二个小孔（图 12)，加入已知稀释度的蛋白抗原。必要时可以采用大载玻片，以便有较多的样品孔同时电泳数量较多的蛋白质样品。电泳蛋白质 90—150 分钟左右(每张玻片约 7.5mA，5—10V/cm)。按前述方法对玻片去蛋白质，染色并干燥。

下一步系测量火箭弧。若继续电泳直至火箭停止移动，火箭的高度即与蛋白质抗原浓度成正比(图 13)。火箭峰高应在 1—5cm 之间。凝胶中抗体浓度应予调整以满足这一需要。画出标准曲线(图 14)，从标准曲线上可测定未知抗原的浓度。注意，这类标准曲线不通过原点。

双向免疫电泳(交叉免疫电泳)

用双向免疫电泳技术可以将火箭免疫电泳加以改进；这一方法对蛋白质混合物的定量以及蛋白质混合物组分的分析特别有益。蛋白质抗原在琼脂糖凝胶中电泳分离（第一向分离)，随后在与第一向呈垂直方向并含抗体的凝胶上进行第二向电泳(图 15)。

首先，将 3ml 加温至 50℃ 的 1.5% 琼脂糖溶液倾注在清洁的显微镜载玻片上，待琼脂糖凝固后，在载玻片的一端打一小孔，加入蛋白质抗原，蛋白质电泳 30—60 分钟（电压

降为 8V/cm)。用一刀片沿凝胶周围切去 0.2cm，并将边缘加以修整。让凝胶从载玻片上滑到 15cm × 17.5cm 玻璃板的一端，玻板的其余部分用含有抗体的 1.5% 琼脂糖溶液涂布。琼脂糖溶液的制备是将抗体稀释 5 倍，再与等体积的 3% 琼脂糖溶液相混合。待

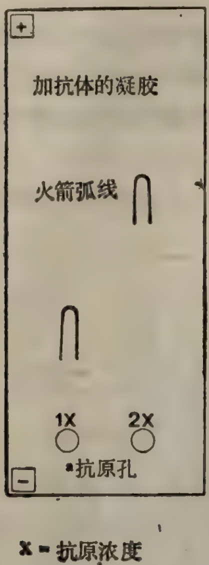


图 12　火箭免疫电泳原理

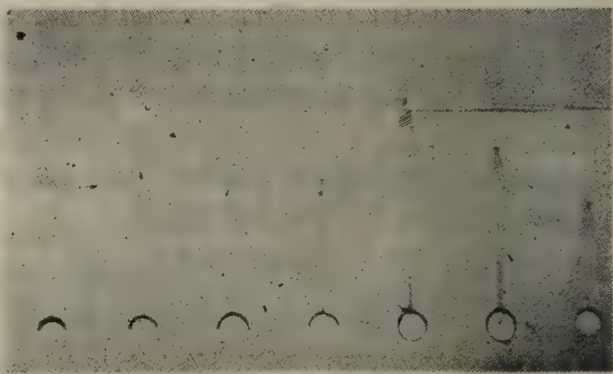


图 13　火箭免疫电泳板：板上有 7 个抗原小孔平行电泳。抗原为构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)的黄嘌呤脱氢酶，在含有兔抗黄嘌呤脱氢酶抗体的凝胶中电泳。右侧三列火箭系原型构巢曲霉的标准抗原浓度，左侧的四只孔含有从各种突变型的子囊菌类获得的抗原制剂(浓度未知)（经 Dr. Heather Sealy-Lewis 允许拍照)。

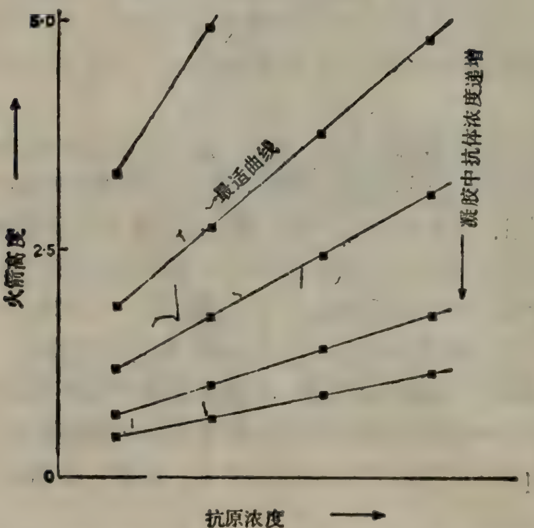


图 14　火箭免疫电泳的标准曲线：每条曲线系在某一固定抗体浓度的凝胶中测得。注意曲线不通过原点。

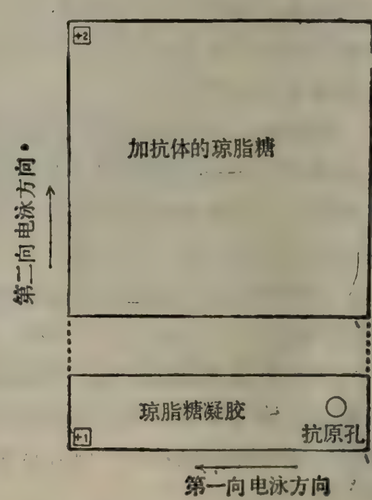


图 15　双向免疫电泳原理(交叉免疫电泳)。

琼脂糖凝固后，将玻板置于电泳槽中并与宽滤纸芯相接，在 1—2V/cm 电压降条件下电泳 8—16 小时。然后可检查凝胶。必要时，可以将凝胶干燥并染色(图 16)。

这种方法有助于提供有关抗原同一性或异质性的信息。图 17 系两种或多种抗原串列 (tandem) 电泳的状况。若第二向电泳后获得的沉淀线融合，表明反应相同，并且可以认为抗原是相同的。若沉淀线交叉，表明为异质反应；齿轮状沉淀线则表明反应部分相

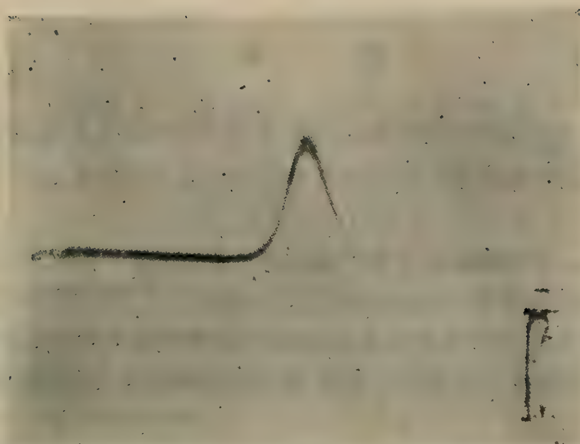


图 16 构巢曲霉的黄嘌呤脱氢酶电泳后，再在含有兔抗黄嘌呤脱氢酶抗体的凝胶上电泳所获得的沉淀线照片。照片上显示出一条弧线，表明该制剂为纯品；水平线表示系统中掺入黄嘌呤脱氢酶的参比样品(见图 18)(经 Heather Sealy-Lewis 博士允许拍照)。

同。在交叉-线免疫电泳 (Cross-line immunoelectrophoresis) 中，可以将某一抗原的参比线掺入到系统中(图 18)。

有关上述基本免疫电泳方法的各种精巧改进的详细说明，读者可参看 Weir[2] 和 Axelsen 等[10]的著作。这类方法中有许多可以用来准确定量蛋白质混合物中的蛋白质抗原。

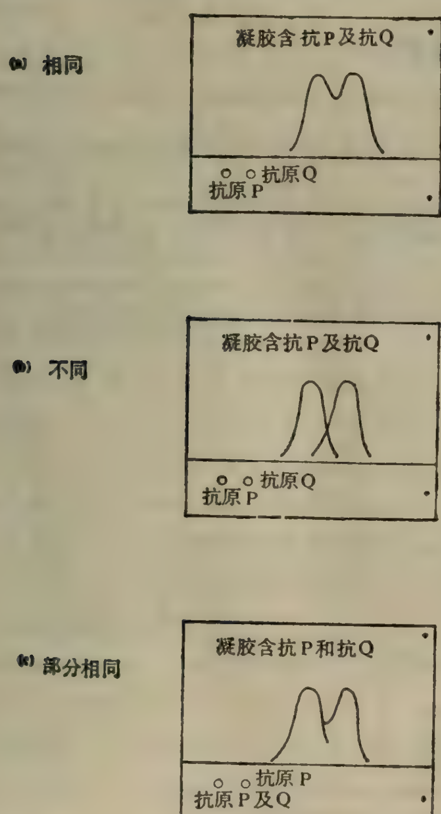


图 17 串列交叉免疫电泳原理。从二孔电泳所获得的电泳图谱表示抗原 (a) 相同，(b) 不同，(c) 部分相同。

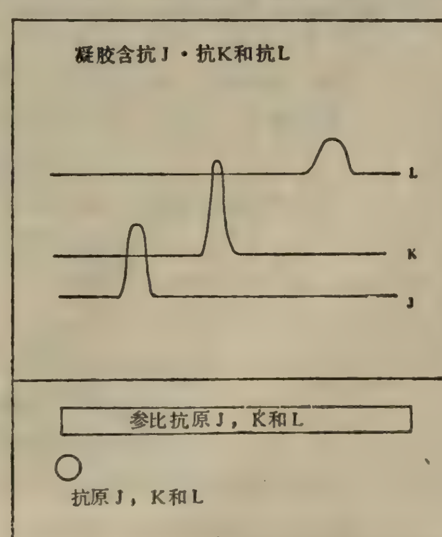


图 18 交叉-线免疫电泳原理。注意，参比抗原在电泳开始后加入。

故　障

与免疫电泳有关的许多问题可以借助经验或通过简单的实验来解决；例如，改变电泳时间、电流和(或)电压可能得到更好的分离或使沉淀区分辨率更好。几个具有共性的其它困难列举如下：

(i) 抗体滴度低。可能需要采用更严格的免疫程序，每7天或14天用抗原免疫一次，连续十周以上。要小心由于使用过量抗原引起的免疫过度，而可能激发对抗原的"高区带耐受性"[或免疫麻痹]，后者可能使抗体完全隐退，以致循环系统中无抗体存在；或者可能使动物遭受外伤，以致免疫应答受抑。注意，随着时间的延长、反复冰冻和熔融，抗血清也容易丧失活性。

(ii) 抗血清与杂蛋白的交叉反应。应当使用较纯的抗原制剂进行免疫，或者可以用杂蛋白吸附抗血清。

(iii) 蛋白质在凝胶上迁移不佳。改变电泳时间或缓冲液的 pH。

(iv) 洗涤时凝胶从载玻片上漂离。使用预先涂布的载玻片(参见免疫电泳一节)。

(v) 染料被部分凝胶而不是被沉淀弧线吸附，是由于不适当的洗涤蛋白质方法所致。

综合性参考文献

Roitt, I. M. (1977) Essential Immunology, 第3版, Blackwell Scientific Publications, Oxford. (一本优秀的有关免疫学原理的导论)。

Hudson, L, and Hay F. C. (1976) Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford. (实用免疫学技术导论；对初学者特别有益)。

Weir, D. M. (ed) (1978) Handbook of Experimental Immunology, Vol 1, Immunochemistry, 第3版, Blackwell Scientific Publications, Oxford. (有关免疫学方法的标准教材：参阅第19章；免疫扩散和免疫电泳法由 O. Ouchterlony 及 L. A. Nilsson 执笔)。

Axelsen, N. H., KrØll, J. and Weeks, B(ed)(1973)A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis: Methods and Applications, Universitetsforlaget, Oslo. (综述了基础免疫电泳原理中某些更精巧的改进方法)。

附录 I　多肽检测方法文献目录

多肽检测的一般方法

染色法

(酰)胺黑 10B，考马斯蓝 R，快绿 FCF 的比较:

Wilson, C. M. (1979) Anal Biochem. **96**, 263.

考马斯蓝 R 250 甲醇-乙酸溶液的应用:

Weber, K and Osbom, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406.

Wilson, C. M. (1979) Anal. Biochem. **96**, 263.

考马斯蓝 R250 异丙醇-乙酸溶液的应用:

Fairbanks, G., Steck. T. L. and Wallach, D. D. H. (1971) Biochemistry **10**, 2606.

快速酸性考马斯蓝染色法不需要脱色:

Blakesley, R. W. and Boezi, J. A. (1977) Anal. Biochem. **82**, 580.

Chrambach, A., Reisfeld, R. A., Wyckoff, M. and Zaccari, J. (1967) Anal. Biochem. **20**, 150.

Diezel, W., Kopperschläger, G. and Hoffman, E. (1972) Anal. Biochem. **48**, 617.

Malik, N. and Berrie, A. (1972) Anal. Biochem. **49**, 173.

Reisner, A. H., Nemes, P. and Bucholtz, C. (1975) Anal. Biochem. **64**, 509.

用快绿对等电聚焦凝胶上的蛋白质染色:

Allen, R. E., Masak, K. C. and McAllister, P. K. (1980) Anal. Biochem. **104**, 494.

高灵敏度的银染色法:

Oakley, B. R., Kirsch, D. R. and Morris, N. R. (1980) Anal. Biochem. **105**, 361.

Switzer, R. C., Merril, C. R. and Shifrin, S. (1979) Anal. Biochem. **98**, 231.

用 Fe^{2+}-bathophenan throline-sulphate 对蛋白质染色:

Graham, G., Nairn, R. S. and Bates, G. W. (1978) Anal. Biochem. **88**, 434.

用丹宁酸 (tannic acid) 染天然蛋白质，以便回收蛋白质:

Aoki, K., Kajiwara, S., Shinke, R. and Nishira, H. (1979) Anal. Biochem. **95**, 575.

电泳前的蛋白质染色法:

Bosshard, H. F. and Datyner, A. (1977) Anal. Biochem. **82**, 327.

Sun, S. M. and Hall, T. C. (1974) Anal. Biochem. **61**, 237.

伪染问题。在某些条件下用考马斯蓝染色可以观察到伪染现象。

用二甲基辛二酰亚胺 (dimethylsuberimidate) 作蛋白质交联剂时的伪染问题:

Burke, W. F. and Reeves, H. C. (1975) Anal. Biochem. **63**, 267.

LKB Ampholines 的伪染问题:

Otavsky, W. I. and Drysdale, J. W. (1975) Anal. Biochem. **65**, 533.

荧光染色法

电泳前用荧光基团标记

丹磺酰氯 (dansyl chloride):

Schetters, H. and McLeod, B. (1979) Anal. Biochem. **98**, 329.

Stephens, R. E. (1975) Anal. Biochem. **65**, 369.

Tjissen, P. and Kurstak, E. (1979) Anal. Biochem. **99**, 97.

荧光胺 (fluorescamine):

Douglas, S. A., La Marca, M. E. and Mets, L. J. (1978) *in* Electrophoresis '78 (Catsimpoolas, N., ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, Vol 2, p. 155.

Eng, P. R. and Parker, C. O. (1974) Anal. Biochem. **59**, 323.

Ragland, W. L., Benton, T. L., Pace, J. L., Beach, F. G. and Wade, A. E. (1978) *in* Electrophoresis'78 (Catsimpoolas, N., ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, Vol. 2, p. 217.

Ragland, W. L., Pace, J. L. and Kemper, D. L. (1974) Anal. Biochem. **59**, 24.

MDPF [2-甲氧基-2, 4-二苯基-3(2H)-呋喃酮] [2-methoxy-2, 4-diphenyl-3(2H)-furanone]:

Barger, B. O., White, F. C. Pace, J. L., Kemper, D. L. and Ragland, W. L. (1976) Anal. Biochem. **70**, 327.

Douglas, S. A. *et al.* (1978) see above.

Ragland, W. L. *et al.* (1978) see above.

DACM [N-(7-二甲基氨基-4-甲基顺式邻羟苯丙烯基)马来酰亚胺] [N-7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl) maleimide]:

Yamamoto, K., Okamoto, Y. and Sekine, T. (1978) Anal. Biochem. **84**, 313.

邻苯二醛 (O-phthaladehyde):

Weidekamm, E., Wallach, D. F. H. and Flückiger, R. (1973) Anal. Biochem. **54**, 102.

电泳后以荧光团标记

这类方法极少用于分析性研究工作中。

苯胺基萘磺酸盐 (anilinonaphthalene sulphonate):

Hartman, B. K. and Udenfriend, S. (1969) Anal. Biochem. **30**, 391.

荧光胺:

Jackowski, G. and Liew, C. C. (1980) Anal. Biochem. **102**, 34.

对-肼基吖啶 (p-Hydrazinoacridine):

Carson, S. D. (1977) Anal. Biochem. **78**, 428.

直接检测法

利用蛋白质的磷光现象:

Mardian, J. K. W. and Isenberg, I. (1978) Anal. Biochem. **91**, 1.

冷冻法检测 SDS-多肽:

Wallace, R. W., Yu, P. H., Dieckart, J. P. and Dieckart, J. W. (1974) Anal. Biochem. **61**, 86.

通过与 K^+ 离子形成沉淀，检测 SDS-多肽：

Nelles, L. P. and Bamburg, J. R. (1976) Anal. Biochem. **73**, 522.

用醋酸钠检测 SDS-多肽：

Higgins, R. C. and Dahmus, M. E. (1979) Anal. Biochem. **93**, 257.

通过与阳离子表面活化剂反应，检测 SDS-多肽：

Takagi, T., Kubo, K. and Isemura, T. (1977) Anal. Biochem. **79**, 104.

以荧光分子作前标记：参阅荧光染色法部分。

预染：参阅染色方法部分。

以放射性同位素为基础的检测方法

电泳前体外放射性标记蛋白质：参阅附录 II.

凝胶电泳后放射标记蛋白质：Christopher, A. R., Nagpal, M. L., Carroll, A. R. and Brown, J. C. (1978) Anal. Biochem. **85**, 404.

Elder, J. H., Pickelt, R. A., Hampton, J. and Lerner, R. A. (1977) J. Biol. Chem. **252**, 6510.

放射标记探针的应用：

放射标记抗体或蛋白质 A

放射标记外源凝集素

用 X 射线增感屏 (X-ray intensifying screen) 进行间接放射自显影 (^{125}I, ^{32}P)：

Laskey, R. A. (1980) *in* Methods in Enzymology (Grossman, L. and Moldave, K., eds), Academic press, New York, Vol. 65, p. 363.

Laskey, R. A. and Mills, A. D. (1977) FEBS Lett. **82**, 314.

用 PPO 作荧光显影 (^{35}S, ^{14}C, ^{3}H)：

Bonner, W. M. and Laskey, R. A. (1974) Eur. J. Biochem. **46**, 83.

Laskey, R. A. (1980) *in* Methods in Enzymology (Grossman, L. and Moldave, K., eds), Academic Press, New York, Vol. 65, p. 363.

Laskey, R. A. and Mills, A. D. (1975) Eur. J. Biochem. **56**, 335.

用水杨酸钠进行荧光显影：

Chamberlain, J. P. (1979) Anal. Biochem. **98**, 132.

用 X 射线胶片作双标记检测：

Gruenstein, E. I. and Pollard, A. L. (1976) Anal. Biochem. **76**, 452.

Kronenberg, L. H. (1979) Anal. Biochem. **93**, 189.

McConkey, E. H. (1979) Anal. Biochem. **96**, 39.

Walton, K. E., Styer, D. and Gruenstein, E. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 795.

特殊多肽的检测方法

糖蛋白

高碘酸席夫法 (Periodic Acid Schiff) (PAS):

已经发表了许多改进方法,其中一部分列举如下:

Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. L. H. (1971) Biochemistry **10**, ~~2026.~~ 2606

✓Glossman, H. and Neville, D. M. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 6339.

Matthieu, J. M. and Quarles, R. H. (1973) Anal. Biochem. **55**, 313.

Zaccharias, R. J., Zell, T. E., Morrison, J. H. and Woodlock, J. J. (1969) Anal. Biochem. **31**, 148.

Alcian blue:

Wardi, A. H. and Michos, G. A. (1972) Anal. Biochem. **49**, 607.

对-肼基吖啶(荧光染料):

Carson, S. D. (1977) Anal. Biochem. 78, 428.

唾液酸糖肽的全染色:

Green, M. R. and Pastewka, J. V. (1975) Anal. Biochem. **65**, 66.

King, L. E. and Morrison, M. (1976) Anal. Biochem. **71**, 223.

麝香草酚和硫酸:

Racusen, D. (1979) Anal. Biochem. **99**, 474.

荧光外源凝集素 (fluorescent lectins):

Furlan, M., Perret, B. A. and Beck, E. A. (1979) Anal. Biochem. **96**, 208.

放射标记的外源凝集素:

Burridge, K. (1978) *in* Methods in Enzymology (Ginsburg, V., ed.), Academic Press, New York, Vol. 50, p. 54.

Rostas, J. A. P., Kelly, P. T. and Cotman, C. W. (1977) Anal. Biochem. **80**, 366.

与乙醇脱氢酶或乳酸脱氢酶共价结合的外源凝集素:

Avigad, G. (1978) Anal. Biochem. **86**, 443.

与辣根过氧化物酶共价结合的外源凝集素:

Wood, J. G. and Sarinana, F. O. (1975) Anal. Biochem. **69**, 320.

交叉外源凝集素电泳:

West, C. M. and McMahon, D. (1977) J. Cell Biol. **74**, 264.

用半乳糖氧化酶标记细胞表面糖蛋白:

Gahmberg, C. G. (1978) *in* Methods in Enzymology (Ginsburg, V., ed.), Academic Press, New York, Vol. 50, p. 204.

用半乳糖基转移酶标记含有末端 N-乙酰氨基葡糖的糖蛋白:

Wallenfels, B. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **76**, 3223.

磷蛋白

全染色:

Green, M. R., Pastewka, J. V. and Peacock, A. C. (1973) Anal. Biochem. **56**, **43**.
钼酸铵
Cutting, J. A. and Roth, T. A. (1973) Anal. Biochem. **54**, 386.
酸性磷蛋白(卵黄高磷蛋白)(phosvitin):
Hegenauer, J., Ripley, L. and Nace, G. (1977) Anal. Biochem. **78**, 308.
放射标记

核蛋白

溴化乙锭 (ethidium bromide):
Goodwin, G. H. (1981) *in* Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach (Rickwood, D. and Hames, B. D., eds), Information Retrieval Ltd, London.
全染色:
Dahlberg, A. E., Dingman, C. W. and Peacock, A. C. (1969) J. Mol. Biol. **41**, 139.
Goodwin, G. H. (1981): see above.
亚甲蓝:
Dahlberg *et al*. (1969): see above.
用蛋白吸着法检测结合 DNA 的蛋白质:
Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U. K. and Weintraub, H. (1980) Nucl. Acid Res. **8**, 1.

具有可以进行反应的巯基蛋白质

DACM[N-(7-二甲氨基-4-甲基顺式邻羟苯丙烯基)马来酰亚胺]
Yamamoto, K., Okamoto, Y. and Sekine, T. (1978) Anal. Biochem. **84**, 313.
DTNB [5,5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸)][5,5′-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid)]:
Zelazowski, A. J. (1980) Anal. Biochem. **103**, 307.
含镉蛋白
联吡啶-亚铁碘化物。(dipyridyl-ferrous iodide):
Zelazowski, A. J. (1980) Anal. Biochem. **103**, 307.

胶原(蛋白)及原胶原蛋白

McCormick, P. J. Chandrasekhar, S and Millis, A. J. T. (1979) Anal. Biochem. **97**, 359.

免 疫 方 法

凝胶与放射标记抗体培育:
Burridge, K. (1978) *in* Methods in Enzymology (Ginsburg, V., ed.), Academic Press, New York, Vol. 50, p. 54.
Kasamatsu, H. and Flory, P. J. (1978) Virology **86**, 344.

凝胶先与非标记抗体，随后再与 [^{125}I]-蛋白 A 培育:

Burridge, K. (1978) *in* Methods in Enzymology (Ginsburg, V., ed.), Academic Press, New York, Vol. 50, p. 54.

Adair, W. S., Jurivich, D. and Goodenough, U. W. (1978) J. Cell Biol. **79**, 281.

Bigelis, R. and Burridge, K. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. **82**, 322.

Saltzgaber-Müller, J. and Schatz, G. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 305.

凝胶中的抗原转移至重氮苄氧甲基(diazobenzyloxymethyl paper)化的滤纸上，随后以[^{125}I]-蛋白 A 进行免疫鉴别:

Renart, J., Reiser, J. and Stark, G. R. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci U. S. A. **76**, 3116.

凝胶与荧光素标记抗体培育:

Groschel-Stewart, U., Schreiber, J., Mahlmeister, C. and Weber, K. (1976) Histochemistry **46**, 229.

Stumph, W. E., Elgin. S. C. R. and Hood, L. (1974) J. Immunol. **113**, 1752.

凝胶与偶联过氧化物酶的抗体，然后与 3, 3′-二氨基联苯胺 (3, 3′-diaminobenzidine)培育定位:

Olden, K. and Yamada, K. M. (1977) Anal. Biochem. **78**, 483.

Parish, R. W., Schmidlin, S. and Parish, C. R. (1978) FEBS Lett. **95**, 366.

Van Raamsdonk, W., Pool, C. W. and Heyting, C. (1977) J. Immunol. Methods **17**, 337.

用含有抗血清的琼脂糖覆盖以生成免疫拷贝:

Showe, M. K., Isobe, E. and Onorato, L. (1976) J. Mol. Biol. **107**, 55.

Saltzgaber-Müller, J. and Schatz, G. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 305.

交叉免疫电泳:

Chua, N. H. and Blomberg, F. (1979) J. Biol. Chem. **253**, 3924.

Converse, C. A. and Papermaster, D. S. (1975) Science **189**, 489.

酶 检 测 法

由于 Shaw 和 Prasad[1], Siciliano 和 Shaw[2] 及 Harris 和 Hopkinson[3a,b,c] 最近发表的三篇报告介绍了测定各种酶的试剂的制备和应用，因而具有特殊的实用价值。某一具体酶的测定常常可以应用几种方法。在这方面，Harris 和 Hopkinson[3a,b,c] 提供了大量文献。在已发表的方法中，大多数与淀粉凝胶电泳有关，但是其中有许多也可以应用聚丙烯酰胺凝胶电泳。Gabriel[4] 评述了用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶的方法。下表中列举了能在凝胶上进行检测的酶，每一种酶后还附有特定的可供查阅的实验资料及其它有关参考文献的说明。有关在凝胶上检测酶的一般方法及某些注意事项已在本书前述章节中讨论。

酶	**参考文献**
酸性磷酸酶	[1],[2],[3a], [4], [5]
(顺)乌头酸酶	[1], [2], [3a], [6]
腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(AMP 焦磷酸化酶)	[3a], [7], [8]

腺苷脱氨酶	[2], [3a], [9]
腺苷激酶	[3c], [10]
腺苷酸激酶	[1], [2], [3a], [11]
ADP-糖原转移酶	[4], [12]
丙氨酸氨基转移酶	[2], [3a], [13]
(乙)醇脱氢酶	[1], [2], [3a], [4], [14], [15]
醛缩酶	[1], [2], [3a], [16]
碱性磷酸酶	[1], [3a], [4], [17]
胺氧化酶	[4], [18]
氨基酸氧化酶	[3b], [4], [19], [20]
AMP 脱氨酶	[3c], [21], [22]
淀粉酶	[3a], [4], [23], [24]
邻氨基苯甲酸合成酶	[25]
精氨酸酶	[3c], [21], [26]
精氨(基)琥珀酸(裂解)酶	[3c], [21]
芳香族氨基酸脱羧酶	[27]
芳香族氨基酸转氨酶	[1]
芳基酰胺酶类	[4]
芳基硫酸酯酶	[3a], [28], [29]
天冬氨酸转氨酶	[1], [2], [3a], [4], [30]
碳酸酐酶	[1], [3a], [31], [32]
过氧化氢酶	[1], [2] 和 [3a] (仅在淀粉凝胶上),[4]
纤维二糖磷酸化酶	[4]
纤维素酶	[33]
胆碱酯酶	[4], [34]
糜蛋白酶	[35]
柠檬酸合成酶	[3a], [36]
肌酸激酶	[1], [3a], [4], [37]
3′5′ 环 AMP 磷酸二酯酶	[3a], [4], [38]
胞苷脱氨酶	[3a], [39]
细胞色素 b₅ 还原酶	[3a], [40], [41]
二氢尿嘧啶脱氢酶	[43]
二肽酶	[42](也可参阅肽酶)
DNA 聚合酶	[4], [44]
弹性蛋白酶及弹性蛋白酶原	[45]
烯醇酶	[2], [3a], [46]
酯酶	[1], [2], [3a], [4], [5], [47]
叶酸盐还原酶	[4]
果糖-1,6-二磷酸酶	[1]
果糖基转移酶	[48]
L-岩藻糖脱氢酶	[49]
α-岩藻糖苷酶	[3a], [4], [50]
延胡索酸酶	[1], [2], [3c], [51]
半乳糖激酶	[3a], [4], [52]
半乳糖-6-磷酸脱氢酶	[1]
半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶	[3a], [4], [53] (也可参阅半乳糖基转移酶项)
α-半乳糖苷酶	[2], [3a], [54], [55]
β-半乳糖苷酶	[3a], [4], [56], [57], [58]
半乳糖基转移酶	[59]
葡萄糖氧化酶	[4]

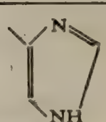
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	[1], [2], [3a], [60]
α-葡糖苷酶	[3a], [4], [61]
β-葡糖苷酶	[3a], [4], [62]
β-葡糖苷酸酶	[1], [2], [3b], [63], [64]
谷氨酸脱氢酶	[1], [3b], [4], [65]
谷氨酸-草酰乙酸转氨酶	见天冬氨酸氨基转移酶
谷氨酸-丙酮酸转氨酶	见丙氨酸氨基转移酶
谷氨酰胺酶	[66]
谷胱甘肽过氧化物酶	[3a], [67]
谷胱甘肽还原酶	[1], [3a], [68]
谷胱甘肽S转移酶	[69]
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	[1], [2] [3a], [4], [70]
甘油激酶	[4], [8]
甘油-3-磷酸脱氢酶	[1], [2], [3a], [4], [70]
糖原磷酸化酶	[4]
glycolate oxidase	[3c], [71]
糖苷酶	[4], [72], [73]
乙二醛酶	[3a], [3b], [70], [74], [75]
鸟嘌呤(脱氨)酶	[3a], [4]
鸟苷酸激酶	[3a], [76]
己糖激酶	[1], [3a], [4], [8], [77], [78]
氨基己糖酶	见 β-N-乙酰氨基己糖苷酶
高丝氨酸脱氢酶	[4], [79]
羟酰辅酶A脱氢酶	[3b], [80]
D(-)3-羟丁酸脱氢酶	[1]
羟类固醇脱氢酶	[4]
次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶	[1], [3a], [4], [8], [81]
无机焦磷酸酶	[1], [3a], [4], [82]
次黄(嘌呤核)苷三磷酸酶	[3a]
转化酶	[83]
异柠檬酸脱氢酶	[1], [2], [3a], [4], [84], [85]
异柠檬酸(裂合)酶	[86]
α-酮戊二酸半醛脱氢酶	[4]
α-酮异己酸脱氢酶	[4]
α-酮-β-甲基戊酸脱氢酶	[4]
乳酸脱氢酶	[1], [2], [3a], [4], [87], [88]
亮氨酸氨肽酶	[1], [89]
脂酶	[4], [90] (也可参阅磷酸脂酶)
硫辛酰脱氢酶	[4], [91]
苹果酸脱氢酶	[1], [2], [3a], [4], [92]
苹果酸合成酶	[93]
苹果酸酶	[2], [3a], [94], [95]
甘露糖-磷酸异构酶	[2], [3a], [96]
α-甘露糖苷酶	[2], [3a], [73], [97]
β-N-乙酰-氨基己糖苷酶	[2], [3a], [98]
NADH 心肌黄酶	也可参阅细胞色素 b, 还原酶
NAD (P) 核苷酶	[3b], [99], [100]
硝酸盐还原酶	[4],[101]
亚硝酸盐还原酶	[102]
核酸酶类	[103], [104](也可参阅核糖核酸酶)
核苷磷酸化酶	[2], [3a], [105], [106]

核苷酸酶	[4],[107]
鸟氨酸氨甲酰基转移酶	[3a], [108]
氧化酶	[4],[109]
PEP 羧化酶	[110]
肽酶类	[1], [2],[3a], [111], [112] (也可参阅二肽酶,三肽酶)
过氧化物酶	[1],[2],[5]
磷酸类	参阅有关的磷酸酶
磷酸果糖激酶	[3a], [4], [113], [114]
磷酸葡糖异构酶	[1], [2], [3a], [115]
葡糖磷酸变位酶	[1], [2], [3a], [3b], [4], [116]
磷酸葡糖酸脱氢酶	[1], [2], [3a], [4], [117]
磷酸甘油酸激酶	[2], [3a], [118]
磷酸甘油酸变位酶	[2], [3a], [119], [120]
磷酸乙醇酸磷酸酶	[3c], [121]
磷脂酶	[122]
磷酸转移酶	[8]
血纤维蛋白溶酶原激活剂	[123]
多核苷酸磷酸化酶	[4], [124]
蛋白酶	[123],[125],[126](也可参阅肽酶,枯草杆菌蛋白酶,糜蛋白酶,胰蛋白酶, 弹性蛋白酶,血纤维蛋白溶酶原激活剂)
蛋白酶抑制剂	[127]
蛋白激酶	[128],[129]
吡哆醇激酶(吡哆醛激酶)	[3b], [130]
焦磷酸酶	可参阅无机焦磷酸酶
丙酮酸羧化酶	[110]
丙酮酸激酶	[2], [3a], [131]
视黄醇脱氢酶	[1]
核糖核酸酶	[1],[4],[132](也可参阅核酸酶)
山梨(醇)糖脱氢酶	[1], [3a], [70]
枯草杆菌蛋白酶	[133]
蔗糖磷酸化酶	[4]
亚硫酸氧化酶	[134]
超氧化物歧化酶	[3a], [135], [136]
苏氨酸脱氨酶	[137]
胸苷激酶	[1]
海藻糖酶	[138],[139]
磷酸丙糖异构酶	[1], [2], [3a], [139], [140]
三肽酶	[141]
胰蛋白酶	[142]
酪氨酸转氨酶	[143]
UDPG 脱氢酶	[4]
UDPG 焦磷酸化酶	[3a], [4], [144]
UMP 激酶	[3a], [145]
脲酶	[4],[146]
黄嘌呤脱氢酶	[1]

附录 II 同位素标记蛋白质用试剂

许多用于同位素标记蛋白质的试剂已有商品供应，下文中将予以概括。 表中列出的试剂是按字母顺序排列并述及其性质与应用有关的参考文献。

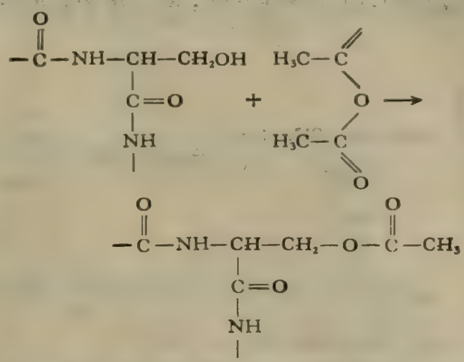
一 览 表

反 应 基 团	标 记 试 剂
$-NH_2$ 游离氨基 （N末端或赖氨酸残基）	乙酸酐 Bolton 和 Hunter 试剂 丹磺酰氯 乙基亚胺乙酯 (Ethyl acetimidate) 1-氟-2，4-二硝基苯 甲醛 isethionyl acetimidate 马来酸酐 甲基3,5-二碘羟基苯亚胺 (methyl 3, 5-diiodohydro-xybenzimidate) 异硫氰酸苯酯 (phenyl isothiocyanate) 氢硼化钠/氢硼化钾琥珀酸酐 N-琥珀酰亚胺丙酸 (N-succinimidyl propionate)
-SH 巯基 （半胱氨酸残基）	乙酸酐 溴乙酸 氯乙酸 对-氯汞苯磺酸 (p-chloromercuribenzenesulphonic acid) 对-氯汞苯甲酸 (p-chloromercuribenzoic acid) 丹磺酰氯 N-乙基马来酰亚胺 碘乙酰胺 碘乙酸 (Iodoacetamide)
 酚羟基 （酪氨酸残基）	乙酸酐 丹磺酰氯 碘
 咪唑基 （组氨酸残基）	丹磺酰氯 碘
$-CH_2OH$ 脂肪族羟基 （丝氨酸/苏氨酸残基）	乙酸酐 二异丙基氟磷酸 (DFP)

试　　剂

乙酸酐 (^3H 或 ^{14}C)

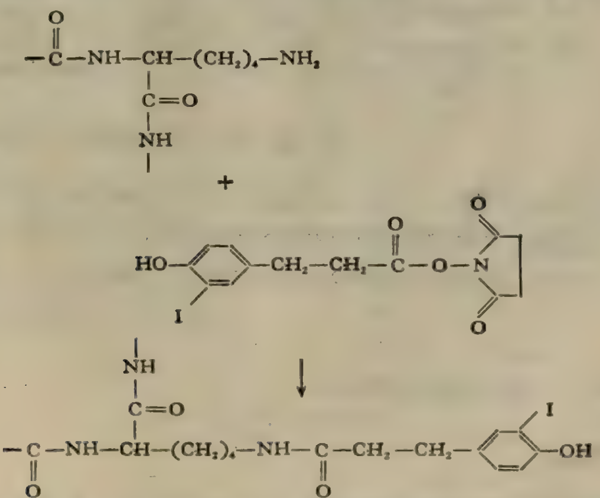
乙酸酐是非专一性的酰化剂，可用来标记丝氨酸、赖氨酸、苏氨酸、酪氨酸或半胱氨酸和 N末端残基。



1. Avivi, P., Simpson, S. A., Tait, J. F. and Whitehead, J. K. (1954) Proceeding 2nd Radioisotope Conference, Oxford; Butterworths, London; Vol. 1, p. 313.
2. O'Leary, M. H. and Westheimer, F. H. (1968) Biochemistry **7**, 913.
3. Ostrowski, K., Barnard, E. A., Sawicki, W., Chorzelski, T., Langner, A. and Mikulski, A. (1970) J. Histochem. Cytochem. **18**, 490.
4. Heinegård, D. K. and Hascall, V. C. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 921.
5. Whitehead, J. K. (1958) Biochem. J. **68**, 662.
6. Barnard, E. A., Wieckowski, J. and Chiu, T. H. (1971) Nature (London) **234**, 207.
7. Brems, D. N. and Rilling, Hans, C. (1979) Biochemistry **18**, 860.
8. Gersten, D. M. and Goldstein, L. S. (1979) Int. J. Appl. Radiat. Isot. **30**, 469.

Bolton 和 Hunter 试剂 (^{125}I)

本试剂对游离氨基具专一性，已广泛用于温和的反应条件下碘标记蛋白质。



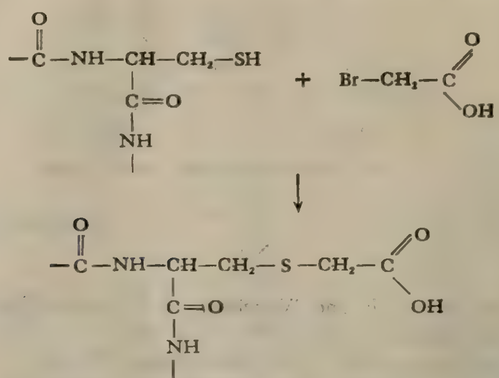
1. Kågedal, B. and Källberg, M. (1977) Clin. Chem. **23**, 1694.
2. Roberts, R., Sobel, B. E. and Parker, C. W. (1978), Clin. Chim. Acta **83**, 141.

3. Culvenor, J. G. and Evans, W. H. (1977) Biochem. J. **168**, 475.
4. Pinder, J. C., Phethean, J. and Gratzer, W. B. (1978) FEBS Lett. **92**, 278

溴乙酸 (^{14}C)

卤乙酸、溴、氯和碘乙酸是应用最广泛的蛋白质烷基化试剂，主要与半胱氨酸残基反应。反应性与卤化物性质有关，并按照碘乙酸＞溴乙酸＞氯乙酸顺序降低。

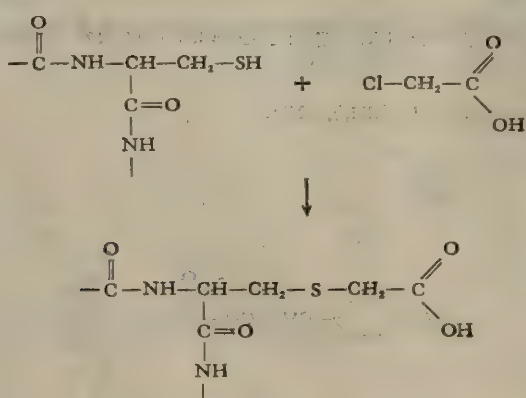
溴乙酸是相当温和的烷化剂，但选择性不强，除屏蔽极好的巯基外，溴乙酸与大多数巯基反应。



1. Glick, D. M., Goren, H. J. and Barnard, E. A. (1967) Biochem. J. **102**, 7c.
2. Fanger, M. W., Hettinger, T. P. and Harbury, H. A. (1967) Biochemistry **6**, 713.

氯乙酸 (^{14}C)

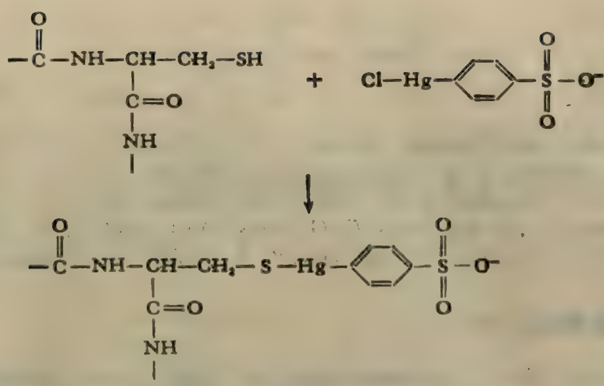
氯乙酸反应性低于溴乙酸。由于它只能与蛋白质中反应活性最大的巯基反应，因此用于选择性极强的烷化反应中。



1. Gerwin, B. I. (1967) J. Biol. Chem. **242**, 451.

对-氯汞苯磺酸 (^{203}Hg)

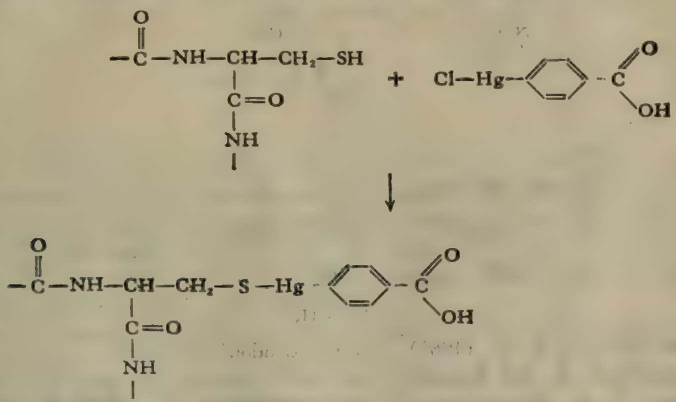
在 pH5 左右条件下，有机汞能迅速而专一地与巯基反应。这类汞盐有强烈的紫外吸收，反应可用于定量。



1. Velick, S. F. (1953) J. Biol. Chem. **203**, 563.

对-氯汞苯甲酸 (^{203}Hg)

与对-氯汞苯磺酸相似，本试剂用于以 ^{203}Hg 标记巯基。

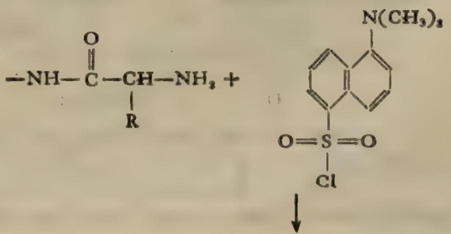


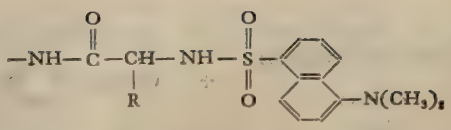
1. Waterman, M. R. (1974) Biochim. Biophys. Acta **371**, 159.
2. Boyer, P. D. (1954) J. Am. Chem. Soc. **76**, 4331.
3. Bucci, E. and Fronticelli, C. (1965) J. Biol. Chem. 240, PC551.
4. Guha, A., Englard, S. and Listowsky, I. (1968) J. Biol. Chem. **243**, 609.
5. Erwin, V. G. and Pedersen, P. L. (1968) Anal. Biochem. **25**, 477.

丹磺酰氯(5-二甲胺-1-萘磺酰氯) (^{3}H 或 ^{14}C)

丹磺酰氯与氨基、巯基、咪唑及酚羟基反应。通常，与脂肪族羟基的反应极慢。

本试剂与蛋白质或多肽末端氨基反应形成具有强烈荧光的磺胺，因而已广泛用于检测微量的蛋白质。生成的磺胺在热酸中稳定，采用丹磺酰氯的分析方法比使用 1-氟-2，4-二硝基苯的方法灵敏度大 100 倍。

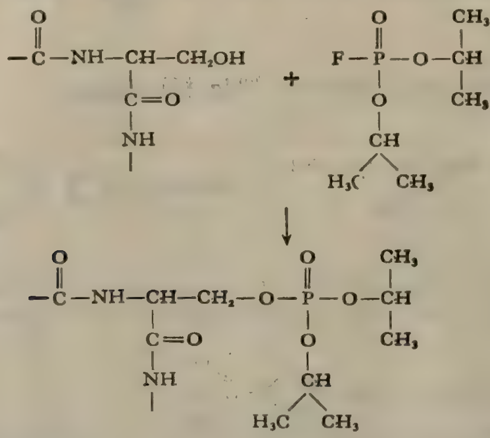




1. Chen, R. F. (1968) Anal. Biochem. **25**, 412.
2. Gray, W. R. and Hartley, B. S. (1963) Biochem. J. **89**, 59P.
3. Schultz, R. M. and Wassarman, P. M. (1977) Anal. Biochem. **77**, 25.
4. Venn, R. F., Basford, J. M. and Curtis, C. G. (1978) Anal. Biochem. **87**, 278.
5. Airhart, J., Kelley, J., Brayden, J. E. and Low, R. B. (1979) Anal. Biochem. **96**, 45.

DFP（二异丙基氟磷酸）(^3H)

二异丙基氟磷酸（DFP）是丝氨酸残基的专一试剂，在许多蛋白酶和酯酶中，它以一种伪底物的方式与活性部位丝氨酸反应。亲电子的磷与羟基反应形成稳定的修饰酶。

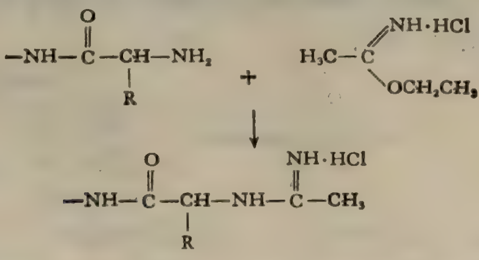


1. Darzynkiewicz, Z. and Barnard, E. A. (1967) Nature (London) **213**, 1198.
2. Budd, G. C., Darzynkiewicz, Z. and Barnard, E. A. (1967) Nature (London) **213**, 1202.
3. Ostrowski, K., Barnard, E. A., Darzynkiewicz, Z. and Rymaszewska, D. (1964) Exp. Cell Res. **36**, 43.
4. Rogers, A. W., Darzynkiewicz, Z., Salpeter, M. M., Ostrowski, K. and Barnard, E. A. (1969) J. Cell Biol. **41**, 665.
5. Fischer, E. P. and Thompson, K. S. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 50.

乙基亚胺乙酯 (^{14}C)

本试剂在相当温和的条件下专一地与游离氨基反应。 能渗入细胞而不损坏膜的功能，并且能在生理条件下标记蛋白质。

在水中乙基亚胺乙基迅速水解，但产物不干扰主要反应。

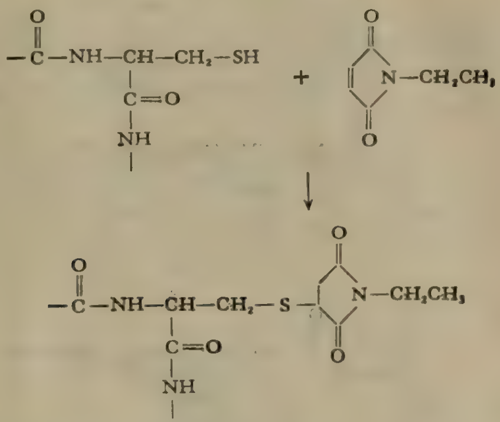


1. Hunter, M. J. and Ludwig, M. L. (1962) J. Am. Chem. Soc. **84**, 3491.

2. Whiteley, N. M. and Berg, H. C. (1974) J. Mol. Biol. **87**, 541.

N-乙基马来酰亚胺 (^{14}C)

本试剂专一地与更为暴露的巯基反应，在中性 pH 条件下，可以在很大的温度范围内应用。虽然 N-乙基马来酰亚胺能定量地测定巯基，但也可以广泛用来研究活性部位的巯基取代对酶活性的影响。

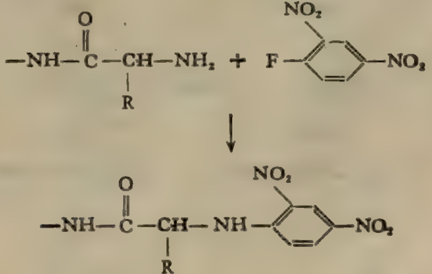


1. Sekine, T., Barnett, L. M. and Kielley, W. W. (1962) J. Biol. Chem. **237**, 2769.
2. Lai, Tzen-son (1971) J. Chin. Chem. Soc. (Taipei) **18**(3), 145.
3. Barns, R. J. and Keech, D. B. (1968) Biochim. Biophys. Acta **159**, 514.
4. Yamada, S. and Ikemoto, N. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 6801.
5. Kielley, W. W. and Barnett, L. M. (1961) Biochim. Biophys. Acta **51**, 589.
6. Riggs, A. (1961) J. Biol. Chem. **236**, 1948.
7. Gadasi, H., Maruta, H., Collins, J. H. and Korn, E. D. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 3631.

1-氟-2,4-二硝基苯 (^{3}H 或 ^{14}C)

该试剂广泛用于在弱碱条件下鉴别末端氨基酸。修饰肽水解后可以分离出 N-末端残基并可以与标准比较来鉴别。

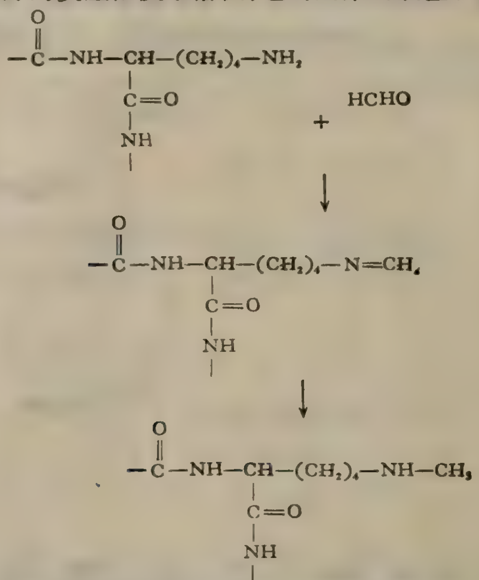
在强碱 pH 条件下，1-氟-2，4-二硝基苯也与酚基、巯基和咪唑基反应，但在 pH8 用 2-巯基乙醇处理修饰的蛋白质，可以取代这类二硝基苯基。



1. Whitehead, J. K. (1961) Biochem. J. **80**, 35P.
2. Schultz, R. M., Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1978) Anal. Biochem. **91**, 354.
3. Travis, J. and McElroy, W. D. (1966) Biochemistry **5**, 2170.
4. Gerber, G. B. and Remy-Defraigne, J. (1965) Anal. Biochem. **11**, 386.

甲醛（^{14}C）

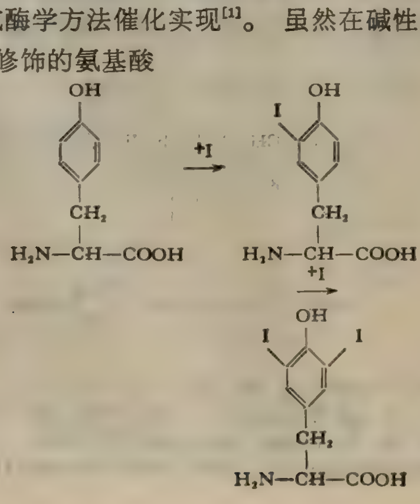
甲醛主要与诸如氰氢硼化钠之类的还原剂合并应用，可游离氨基进行还原性甲基化。然而，由于该试剂具有良好的反应性及水溶性，也可用来与巯基和氨基反应产生交联。



1. Dottavio-Martin, D. and Ravel, J. M. (1978) Anal. Biochem. **87**, 562.
2. Rice, R. H. and Means, G. E. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 831.
3. Nelles, L. P. and Bamburg, J. R. (1979) Anal. Biochem. **94**, 150.
4. Peterson, D. T., Merrick, W. C. and Safer, B. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 2509.
5. Tolleshaug, H., Berg, T., Frölich, W. and Norum, K. R. (1979) Biochim. Biophys. Acta **585**, 71.
6. MacKeen, L. A., DiPeri, C. and Schwartz, I. (1979) FEBS Lett. **101**, 387.

碘（^{125}I）

由于 [^{125}I]-碘半衰期较 ^{131}I 长（^{125}I 为 60 天，^{131}I 为 8 天），而且其 γ 射线穿透力较弱，使用时较安全，因此常用 ^{125}I 来标记蛋白质。碘化作用系在适于形成阳离子 ^{+}I 的氧化环境下应用碘化钠来实现。要保存蛋白质活性，反应条件的选择是极重要的，但是 ^{+}I 离子的形成可以用化学反应或酶学方法催化实现[1]。虽然在碱性更强的条件下，组氨酸也可以碘化，但酪氨酸是最常修饰的氨基酸

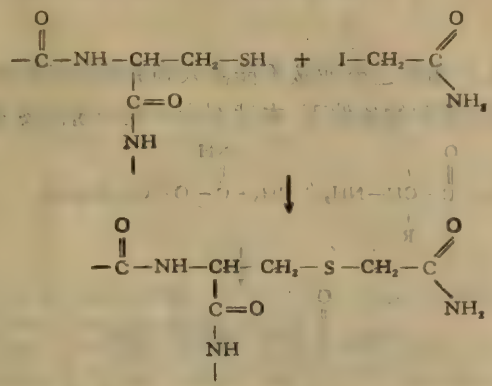


另一种极为温和的 ^{125}I 标记程序系应用对氨基特异的 Bolton 和 Hunter 试剂。

1. Bolton, A. E. (1977) Radioiodination techniques (Review 18), Radiochemical Centre, Amersham, England.
2. Samols, E. and Williams, H. S. (1961) Nature (London) **190**, 1211.
3. Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S. (1963) Biochem. J. **89**, 114.
4. Redshaw, M. R. and Lynch, S. S. (1974) J. Endocrinol. **60**, 527.
5. Thorell, J. I. and Johansson, B. G. (1971) Biochim. Biophys. Acta **251**, 299.

碘乙酰胺 (^{14}C)

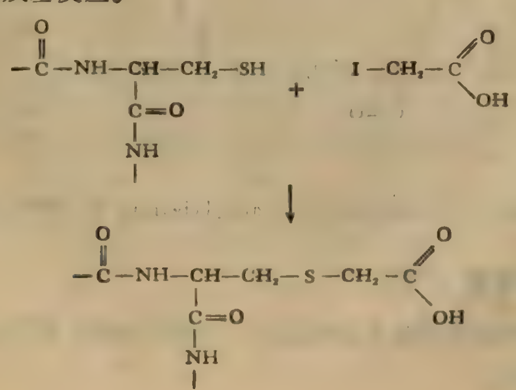
碘乙酰胺与半胱氨酸残基反应，其羧酰胺反应常常用于将蛋白质中的每一半胱氨酸转变成衍生物，该衍生物在缺氧条件下，对酸水解稳定。



1. Truitt, C. D., Hermodson. M. A. and Zalkin. H. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 8470.
3. Inagami, T. and Hatano, H. (1969) J. Biol. C**453**.
2. Inagami, T. (1965) J. Biol. Chem. **240**, PC 3hem. **244**, 1176.
4. Heinrikson, R. L. (1966) J. Biol. Chem. **241**, 1393.
5. Anderson, J. M. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 939.
6. Toste, A. P. and Cooke, R. (1979) Anal. Biochem. **95**, 317.
7. Nusgens, B. and Lapiede, Ch. M. (1979) Anal. Biochem. **95**, 406.
8. Kröger, M., Sternbach, H. and Cramer, F. (1979) Eur. J. Biochem. **95**, 341.

碘乙酸 (^{3}H 或 ^{14}C)

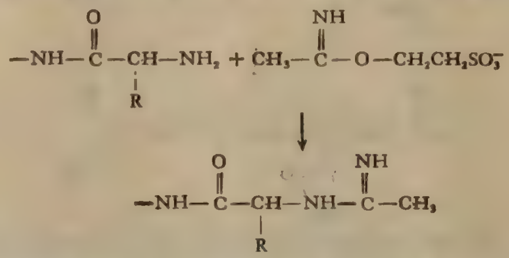
碘乙酸在诸卤族乙酸中的反应性最强(见溴乙酸和氯乙酸)。主要与半胱氨酸残基反应，但选择性不强。随着 pH 降低，反应性增加，碘乙酸也将与甲硫氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸残基反应。



1. Takahashi, K., Stein, W. H. and Moore, S. (1967) J. Biol. Chem. **242**, 4682.
2. Baldwin, G. S., Waley, S. G. and Abraham, E. P. (1979) Biochem. J. **179**, 459.
3. Harris, I., Meriwether, B. P. and Harting Park, J. (1963) Nature (London) **198**, **154**.
4. Colman, R. F. (1968) J. Biol. Chem. **243** 2454.
5. Price, P. A., Moore, S., and Stein, W. H. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 924.
6. Li, T. K. and Vallee, B. L. (1965) Biochemistry **4**, 1195
7. Crestfield A. M., Stein, W. H. and Moore, S. (1963) J. Biol. Chem. **238**, 2413.
8. Neumann, R. P., Moore, S. and Stein, W. H. (1962) Biochemistry **1**, 68.
9. Weinryb, I. (1968) Arch. Biochem. Biophys. **124**, 285.
10. Baldwin, G. S., Waley, S. G. and Abraham, E. P. (1979) Biochem. J. **179**, 459.
11. Wiman, K., Trägardh, L., Rask, L. and Peterson, P. A. (1979) Eur. J. Biochem. **95**, 265.
12. Holmgren, A. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 3664.
13. Anderson, P. J. (1979) Biochem. J. **179**, 425.

乙磺酰乙酰亚胺 (^{14}C)

与乙酰亚胺乙酯不同，乙磺酰乙酰亚胺不能渗入到完整的细胞中，因此可用来标记膜外表面上的蛋白质。在相当温和的条件下，本试剂专一地与游离氨基反应。

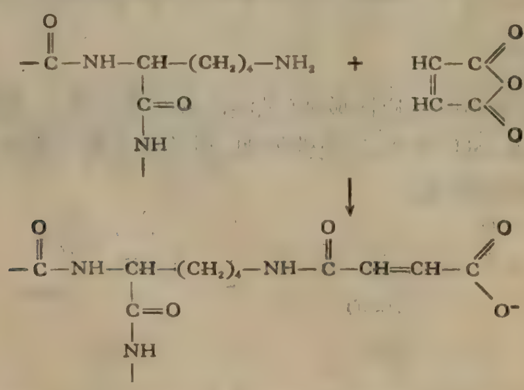


有关使用这种试剂的参考文献，可参阅乙酰亚胺乙酯。

马来酸酐 (^{14}C)

本试剂可以用于氨基的可逆性烷化。马来酰蛋白质易溶于水，在中性 pH 条件下稳定，但酸化时则迅速水解。这种水解比相应的琥珀酰衍生物的水解更迅速(见下文)。

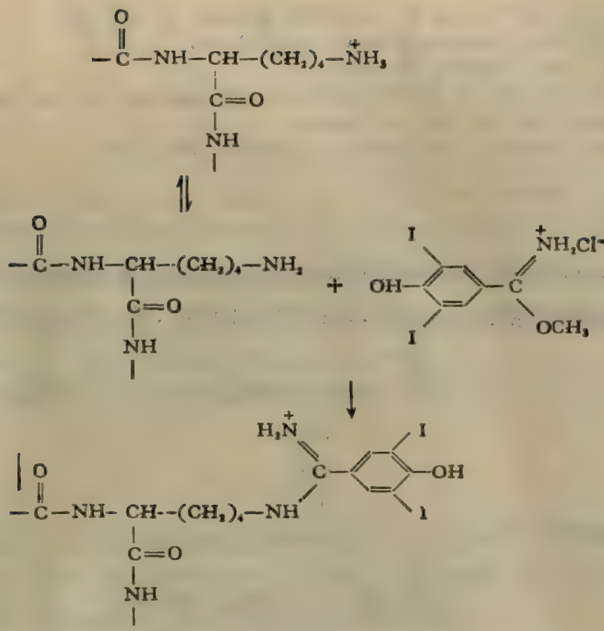
巯基的马来酰化作用极慢，酸化不能逆转这一反应。



1. Butler, P. J. G., Harris, J. I., Hartley, B. S. and Leberman, R. (1969) Biochem. J. **112**, 679.

甲基 3,5-二碘羟基苯亚胺 (^{125}I)

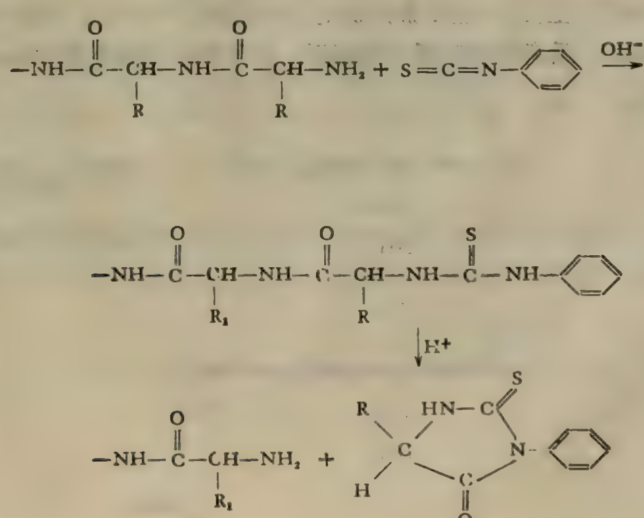
本试剂用来标记赖氨酸残基及末端氨基。它比 Bolton 和 Hunter 试剂温和并具有保存蛋白质电荷的优点。



1. Wood, F. T., Wu, M. M. and Gerhart, J. C. (1975) Anal. Biochem. 69, 339.
2. Ulevitch, R. J. (1978) Immunochemistry 15, 157.
3. Morgan, J. L., Holladay, C. R. and Spooner, B. S. (1978) FEBS Lett. 93, 141.
4. Morgan, J. L., Holladay, C. R. and Spooner, B. S. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 75, 1414.
5. Miller, N. E., Weinstein, D B. and Steinberg, D. (1978) J. Lipid Res. 19, 644.
6. Subramani, S., Bothwell, M. A., Gibbons, I., Yang, Y. R. and Schachman, H. K. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 74, 3777.

异硫氰酸苯酯（^{14}C 或 ^{35}S）

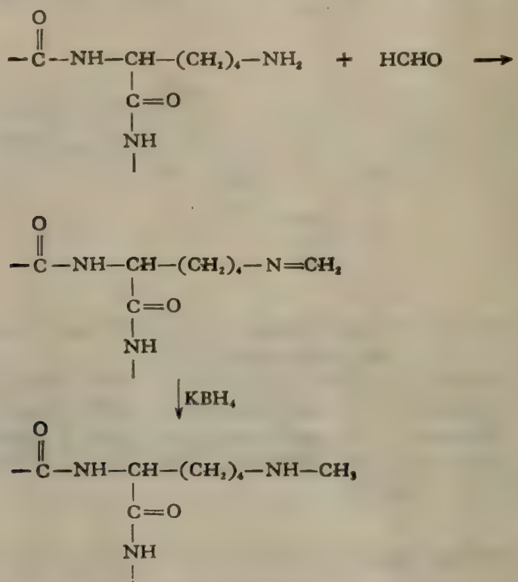
本试剂易与末端氨基反应，因而可以在分步降解过程中用来分析肽的氨基酸序列（edman 降解）。所形成的苯乙内酰硫脲（phenylthiohydatoin）可以通过与标准比较进行鉴定。



1. Callewaert, G. L. and Vernon, C. A. (1968) Biochem. J. **107**, 728.
2. Laver, W. G. (1961) Biochim. Biophys. Acta **53**, 469.
3. Laver, W. G. (1961) Virology **14**, 499.
4. Geising, W. and Hornle, S. (1973) *in* Peptides (Proceedings of the 11th Peptide Symposium, 1971), published 1973, p. 146 (in German).
5. Levy, N. L. and Dawson, J. R. (1976) J. Immunol. **116**, 1526.

氢硼化钾 (^{3}H)

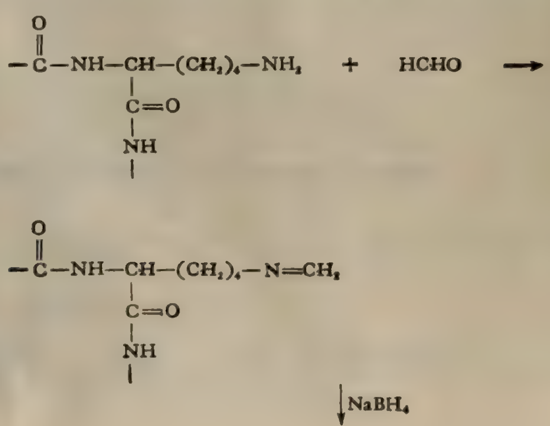
在游离氨基的还原性甲基化反应中，氢硼化钠可以替换氢硼化钾（参见下文）。与在水溶液中立即水解的氢硼化钠不同，本试剂具水溶性，且在水溶液中短时期稳定。

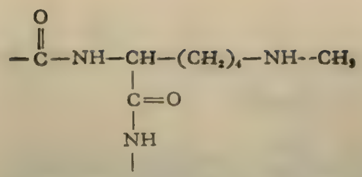


1. Kumarasamy, R. and Symons, R. H. (1979) Anal. Biochem. **95**, 359.

氢硼化钠 (^{3}H)

氢硼化钠与甲醛(见上文)一起使游离氨基发生还原性甲基化。甲醛与氨基反应形成席夫碱 (Schiff's base)，后者再被氢硼化物还原。应用氚标记的氢硼化钠，可以生成 N-[^{3}H] 甲基衍生物。



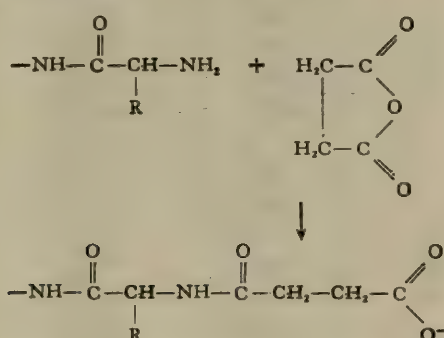


1. Biocca, S., Calissano, P., Barra, D. and Fasella, P. M. (1978) Anal. Biochem. **87**, 334.
2. De La Llosa, P., Marche, P., Morgat J. L. and De La Llossa-Hermier, M. P. (1974) FEBS Lett. 45, 162.
3. Means, G. E. and Feeney, R. E. (1968) Biochemistry **7**, 2192.
4. Moore, G. and Crichton, R. R. (1973) FEBS Lett. **37**, 74.
5. Chansel, D., Sraer, J., Morgat, J. L., Hesch, R. D. and Ardaillou, R. (1977) FEBS Lett. **78**, 237.
6. Ascoli, M. and Puett, D. (1974) Biochim. Biophys. Acta **371**, 203.
7. Keul, V., Kaepueli, F., Ghosh, C., Krebs, T., Robinson, J. A. and Retey, J. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 843.

琥珀酸酐 (^{14}C)

游离氨基的琥珀酰化系在温和的碱性溶液中完成，反应条件与用醋酸酐乙酰化的条件相似。不过，阳离子基团乙酰化产生电中性的产物，而琥珀酰化则产生阴离子产物。由于这一原因，琥珀酰化的蛋白质比乙酰化蛋白质溶解性更强。

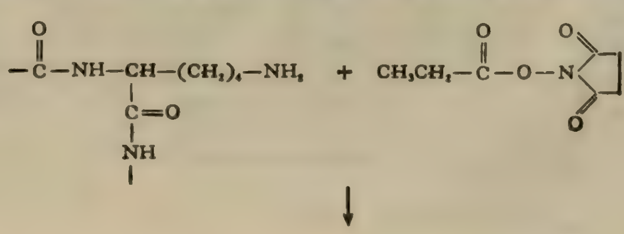
虽然在酸性条件下琥珀酰化反应是可逆的，但是与相应的马来酰化蛋白的水解作用相比较，反应不易进行(见马来酸酐一节)。

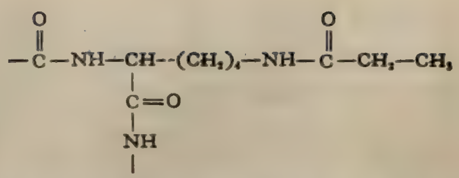


1. Habeeb, A. F. S. A., Cassidy, H. G. and Singer, S. J. (1958) Biochim. Biophys. Acta **29**, **587**.
2. Chu, F. S., Crary, E. and Bergdoll, M. S. (1969) Biochemistry **8**, 2890.
3. Frist, R. H., Bendet, I. J., Smith, K. M. and Lauffer, M. A. (1965) Virology **26**, 558.

N-琥珀酰亚胺丙酸 (^{3}H)

本试剂对游离氨基特异，反应方式与 Bolton 和 Hunter 试剂相似(见上文)。其分子较 Bolton 和 Hunter 小，因而反应时具有对蛋白质结构改变较少的优点。





至今文献中尚未发表有关应用这一化合物的报道。但是放化中心（Radiochemical Centre）（Amersham）已应用本试剂制备 N-[丙酰-^{3}H] 丙酸酯化的 α-金环蛇毒。标记后的蛋白质具有与天然蛋白质相似的生物活性。

附录 III 选择蛋白质标志物的分子量及等电点

下表所列举的是根据亚基数、亚基分子量(无巯基试剂存在条件下)[1]及等电点选择出的蛋白质标志物，其中绝大部分为相当纯的商品。从下列原始文献中可以得到更完整的资料：

分子量：Handbook of biochemistry and Molecular Biology，(第3版；1976)，Proteins Vol II (Fasman, G. D.，编)，CRC 印刷，Cleveland, p. 326。

蛋白质	来源	组织	亚基数	亚基分子量	等电点
腺嘌呤磷酸核糖基转移酶	人	红细胞	3	11,000	4.8
神经生长因子	小鼠	唾液腺	2	13,259	9.3
核糖核酸酶	牛	胰腺	1	13,700	7.8
血红蛋白	兔	红细胞	4	16,000	7.0
小球菌核酸酶	*S. aureus*	—	1	16,800	9.6
β-乳球蛋白	牛	血清	2	17,500	5.2
神经酰胺三己糖苷酶	人	血浆	4	22,000	3.0
腺苷酸激酶	大鼠	肝(胞质液)	3	23,000	7.5
胰蛋白酶原	牛	胰腺	1	24,500	9.3
糜蛋白酶原A	牛	胰腺	1	25,700	9.2
磷酸丙糖异构酶	兔	肌肉	2	26,500	6.8
半乳糖激酶	人	红细胞	2	27,000	5.7
精氨酸酶	人	肝	4	30,000	9.2
脱氧核糖核酸酶 I	牛	胰腺	1	31,000	4.8
尿酸酶	猪	肝脏	4	32,000	6.3
甘油-3-磷酸脱氢酶	兔	肾	2	34,000	6.4
苹果酸脱氢酶	猪	心脏	2	35,000	5.1
(乙)醇脱氢酶	酵母	—	4	35,000	5.4
脱氧核糖核酸酶 II	猪	脾脏	1	38,000	10.2
醛缩酶	酵母	—	2	40,000	5.2
胃蛋白酶原	猪	胃	1	41,000	3.7
己糖激酶	酵母	—	2	51,000	5.3
脂(肪)氧合酶	大豆	—	2	54,000	5.7
过氧化氢酶	牛	肝脏	4	57,500	5.4
碱性磷酸酶	小牛	小肠	2	69,000	4.4
乙酰胆碱酯酶	电鳗	—	4	70,000	4.5
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	兔	肌肉	2	72,000	8.5
β-葡糖苷酸酶	大鼠	肝脏	4	75,000	6.0
赖氨酸脱羧酶	*E. coli*	—	10	80,000	4.6
糖原合成酶	猪	肾	4	92,000	4.8
磷酸烯醇丙酮酸羧化酶	*E. coli*	—	4	99,600	5.0
磷酸烯醇丙酮酸羧化酶	菠菜	叶	2	130,000	4.9
脲酶	刀豆	—	2	240,000	4.9

1) 巯基试剂存在条件下，用于 SDS-PAGE 中合适的多肽分子量请参阅第1章表6。

等电点：Malamud, D. and Drysdale, J. W. (1978)Anal. Biochem. **86**, 620。

Righetti, P. G. 和 Caravaggio, T. (1976) 已经发表了另一篇与蛋白质分子量和等电点有关的资料 (J. Chromatogr. **127**, 1.)。

若已查明标准蛋白质中包含的组分在一种以上，由于选用的蛋白质可能是这一混合物中较次要的一种组分，因此，应用标准蛋白质混合物时应极其谨慎。

附录IV 供应电泳专用附件的厂商

许多大公司已在其它国家建立了子公司，但是大多数较小的公司是通过代理商出售其产品。与下面所列地址联系，可以极为便利地购到所需要的附件：

W and R Balston Ltd.; Springfield Mill, Maidstone, Kent, England.
BDH Chemicals Ltd.; Poole BH12 4NN, Dorset, England.
Bio-Rad Laboratories; 2200 Wright Avenue, Richmond, Calif. 94804, U. S. A.
Boehringer Mannheim GmBH Biochemica; P. O. Box 310120, 6800 Mannheim 31, West Germany.
Buchler Scientific Instruments; Fort Lee, N. J. 07024, U. S. A.
Calbiochem-Behring; La Jolla, Calif. 92037, U. S. A.
Difco Laboratories Ltd.; P. O. Box 14B, Central Avenue, East Moseley, Surrey, England.
Eastman Kodak Co.; 343 State Street, Rochester, N. Y. 14650, U. S. A.
Fisher Scientific Pittsburgh, Pa. 15219, D. S. A.
Gelman Sciences Incorporated; 600 South Wagner Road, Ann Arbor, Mich. 48106, U. S. A. 12 Peter Road, Lancing, Sussex, England.
Gibco Biocult Ltd.; 3 Washington Road, Sandyford Industrial Estate, Palsiey, Renfrewshire PA3 4EP, Scotland.
Hamilton Bonaduz AG; CH 7402 Bonaduz, Switzerland.
Hamilton Co.; Reno, Nev., U. S. A.
Hanimex (UK); Faraday Road, Dorcan, Swindon SN3 5HW, Wiltshire, England.
Hoefer Scientific Instruments; 520 Bryant Street, San Francisco, Calif. 94107, U. S. A.
Ilford Ltd.; Christopher Martin Road, Basildon SS14 3ET, Essex, England.
Ingold Instrumentation; 113 Hartwell Avenue, Lexington, Mass. 02173, U. S. A.
ISCO; P. O. Box 5347, Lincoln, Neb. 68505, U. S. A.
Joyce-Loebl Ltd.; 48 Princes Way, Team Valley, Gateshead on Tyne NE11 OUJ, England.
LKB Produkta AB; S-16125, Bromma, Sweden.
Marine Colloids Division, FMC Corporation; P. O. Box 308, Rockland, Mass. 04841, U. S. A.
Microchemical Specialities; Berkley, Calif. 94707, U. S. A.
Miles Research Products Division, Miles Laboratories Ltd.; Stoke Poges, Slough SL2 4LY, England. Elkhart, Ind. 46514, U. S. A.
Millipore Corporation; Bedford, Mass. 01730, U. S. A. Millipore House, Abbey Road, London NW10 7SP, England.
MRA Corporation; Clearwater, Fla. 33515, U. S. A.
National Technical Information Service (NTIS); Springfield, Va. 22161, U. S. A.
New England Nuclear Research Pdoducts; NEN Chemicals GmBH, Postfach 401240, 6072 Dreieich, West Germany; NEN Corporation, Boston, Mass., U. S. A.
Nordic Immunological Laboratories; P. O. Box 54, Maidenhead, Berkshire, England.
Oxoid Ltd.; Wade Road, Basingstoke RG24 OPW, Hants, England.
Pharmacia Fine Chemicals AB; P. O. Box 175, S-75104, Uppsala 1, Sweden.
Polysciences; Paul Valley Industrial Park, Warrington, Pa. 18976, U. S. A.
Radiochemical Centre; Amersham, Buckinghamshire, England.
Raven Scientific Ltd.; Sturmer End. Haverhill, Suffolk, England.
RND Optical Systems Inc.; 2466 Bowersox Road, New Windsor, Md. 21776, U. S. A.
Savant Instruments; Hicksville, N. Y. 11801, U. S. A.
Serva Feipbiochemica GmBH and Co.: D-6900, Heidelberg 1, P. O. Box 105260, West Germany.
Shandon Southern; 93-96 Chadwick Road, Astmoor Industrial Estate, Runcorn, Cheshire, England.
Sigma Chemical Co.; 3500 Dekalb Street, St. Louis, Mo. 63118, U. S. A.
Small Parts Inc.: 6901 N. E., 3rd Avenue, Miami, Fla. 33138, U. S. A.
Thomas A. H.; Philadelphia, Pa., U. S. A.
Union Carbide Ltd.; Stamford, Conn., U. S. A. Peter House, Oxford Street, Manchester 1, England.
Wellcome Reagents, The Wellcome Foundation Ltd.; 303 Hithergreen Lane, London SE13 6TL, England.

参　考　文　献

第　一　章

综合性参考文献

Gordon,A.H. (1975) Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology; Work,T.S. and Work.E., eds) North-Holland, Amsterdam, Oxford, Vol. 1, pt. 1.

Smith,I. (ed.) (1975) Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. 2. Zone Electrophoresis, William Heinemann Medical Books Ltd., London.

Allen,R.C. and Maurer,H.R. (eds) (1974) Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel, Walter de Gruyter, New York.

Maurer,H.R. (1971) Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin and New York.

正文参考文献

1. Gordon,A.H. (1975) see general references.
2. Smith,I. (1975) *in* Chromatographic and Electrophoretic Techniques (Smith,I., ed.), Vol. 2. Zone Electrophoresis, William Heinemann Medical Books Ltd., London, p. 153.
3. Shapiro,A.L., Vinuela,E. and Maizel,J.V. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. **28**, 815.
4. Weber,K. and Osborn,M. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 4406.
5. Ornstein,L. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. **121**, 321.
6. Davis,B.J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. **121**, 404.
7. Laemmli,U.K. (1970) Nature (London) **277**, 680.
8. Neville,D.M. (1971) J. Biol. Chem., **246**, 6328.
9. Williams,D.E. and Reisfeld,R.A. (1964) Ann. N.Y. Acad Sci. **121**, 373.
10. Reisfeld,R.A., Lewis,V.J. and Williams,D.E. (1962) Nature (London) **195**, 281.
11. Ferguson,K.A. (1964) Metabolism **13**, 21.
12. Rodbard,D., Chrambach,A. and Weiss,G.H. (1974) *in* Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel (Allen,R.C. and Maurer,H.R., eds), Walter de Gruyter, Berlin and New York, p. 62.
13. Hedrick,J.L. and Smith,A.J. (1968) Arch. Biochem. Biophys. **126**, 155.
14. Rodbard,D. and Chrambach,A. (1974) *in* Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel (Allen,R.C. and Maurer,H.R., eds), Walter de Gruyter, Berlin and New York, p. 28.
15. Segrest,J.P. and Jackson,R.L. (1972) *in* Methods in Enzymology (Ginsburg,V., ed.), Academic Press, New York and London, Vol. 28B, p. 54.
16. Studier,F.W. (1973) J. Mol. Biol. **79**, 237.
17. Swaney,J.B., Vande Wonde,G.F. and Bachrach,H.L. (1974) Anal. Biochem. **58**, 337.

18. Payne,J.W. (1973) Biochem. J. **135**, 867.

19. Carpenter,F.H. and Harrington,K.T. (1972) J. Biol. Chem. **247**, 5580.

20. Rice,R.H. and Means,G.E. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 831.

21. Diezel,W., Kopperschläger,G. and Hofmann,E. (1972) Anal. Biochem. **48**, 617.

22. Chrambach,A., Reisfeld,R.A., Wyckoff,M. and Zaccari,J. (1967) Anal. Biochem. **20**, 150.

23. Reisner,A.H., Nemes,P. and Bucholtz,C. (1975) Anal. Biochem. **64**, 509.

24. Fenner,C., Traut,R.R., Mason,D.T. and Wilkman-Coffelt,J. (1975) Anal. Biochem. **63**, 595.

25. Kohler,P.O., Bridson,W.E. and Chrambach,A. (1971) J. Clin. Endocrinol. **32**, 70.

26. Maizel,J.V. (1971) *in* Methods in Virology (Maramorosch,K. and Koprowski,H., eds), Academic Press, New York, Vol. 5, p. 179.

27. Switzer,R.C., Merril,C.R. and Shifrin,S. (1979) Anal. Biochem. **98**, 231.

28. Oakley,B.R., Kirsch,D.R. and Morris,N.R. (1980) Anal. Biochem. **105**, 361.

29. Ragland,W.L., Pace,J.L. and Kemper,D.L. (1974) Anal. Biochem. **59**, 24.

30. Eng,P.R. and Parker,C.O. (1974) Anal. Biochem. **59**, 323.

31. Barger,B.O., White,F.C., Pace,J.C.,Kemper,D.L. and Ragland,W.L. (1976) Anal. Biochem. **70**, 327.

32. Ragland,W.C., Benton,T.L., Pace,J.L., Beach,F.G. and Wade,A.E. (1978) *in* Electrophoresis '78 (Catsimpoolas,N., ed.), Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Vol. 2, p. 217.

33. Hartman,B.K. and Udenfriend,S. (1969) Anal. Biochem. **30**, 391.

34. Jackowski,G. and Liew,C.C. (1980) Anal. Biochem. **102**, 34.

35. Laskey,R.A. and Mills,A.D. (1975) Eur. J. Biochem. **56**, 335.

36. Laskey,R.A. and Mills,A.D. (1977) FEBS Lett. **82**, 314.

37. Bonner,W.M., and Laskey,R.A. (1974) Eur. J. Biochem. **46**, 83.

38. Laskey,R.A. (1980) *in* Methods in Enzymology (Grossman,L. and Moldave,K., eds), Academic Press, New York, Vol. 65, p. 363.

39. Chamberlain,J.P. (1979) Anal. Biochem. **98**, 132.

40. McConkey,E.H. (1979) Anal. Biochem. **96**, 39.

41. Walton,K.E., Styer,D. and Gruenstein,E. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 795.

42. Kronenberg,L.H. (1979) Anal. Biochem. **93**, 189.

43. Peterson,J., Tipton,H.W. and Chrambach,A. (1972) Anal. Biochem. **62**, 274.

44. Goodman,D. and Matzura,H. (1971) Anal. Biochem. **42**, 481.

45. Paus,P.N. (1971) Anal. Biochem. **42**, 372.

46. Hansen,J.N., Pheiffer,B.H. and Boehnert,J.A. (1980) Anal. Biochem. **105**, 192.

47. Spath,P.J. and Koblet,H. (1979) Anal. Biochem. **93**, 275.

48. Anderson,L.E. and McClure,W.O. (1973) Anal. Biochem. **51**, 173.

49. Basch,R.S. (1968) Anal. Biochem. **26**, 184.

50. Ames,G.F. (1974) J. Biol. Chem. **249**, 634.

51. Aloyo,V.J. (1979) Anal. Biochem. **99**, 161.

52. Martin,A.F., Prior,G. and Zak,R. (1976) Anal. Biochem. **72**, 577.

53. Airhart,J., Kelley,J., Brayden,J.E. and Low,R.B. (1979) Anal. Biochem. **96**, 45.

54. Auerbach,S. and Pederson,T. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. **63**, 149.

55. Olden,K. and Yamada,K.M. (1977) Anal. Biochem. **78**, 483.

56. Burridge,K. (1978) *in* Methods in Enzymology (Ginsburg,V., ed.), Academic Press, New York, Vol. 50, p. 54.

57. Renart,J., Reiser,J. and Stark,G.R. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A. **76**, 3116.

58. Chua,N.H. and Blomberg,F. (1979) J. Biol. Chem. **253**, 3924.

59. Showe,M.K., Isobe,E. and Onorato,L. (1976) J. Mol. Biol. **107**, 55.

60. Saltzgaber-Müller,J. and Schatz,G. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 305.

61. Sri Venugopal,K.S. and Adiga,P.R. (1980) Anal. Biochem. **101**, 215.

62. Stephens,R.E. (1975) Anal. Biochem. **65**, 369.

63. Schetters,H. and McLeod,B. (1979) Anal. Biochem. **98**, 329.

64. Mardian,J.K.W. and Isenberg,I. (1978) Anal. Biochem. **91**, 1.

65. Tuszynski,G.P., Damsky,C.H., Fuhrer,J.P. and Warren,L. (1977) Anal. Biochem. **83**, 119.

66. Hanaoka,F., Shaw,J.C. and Mueller,G.C. (1979) Anal. Biochem. **99**, 170.

67. Swank,R.W. and Munkres,K.D. (1971) Anal. Biochem. **39**, 462.

68. Panyim,S. and Chalkley,R. (1969) Arch. Biochem. Biophys. **130**, 337.

69. Franklin,S.G. and Zweidler,A. (1977) Nature (London) **266**, 273.

70. Zweidler,A. (1978) *in* Methods in Cell Biology (Stein,G., Stein,J. and Kleinsmith,L.J., eds), Academic Press, New York, Vol. 27, p. 223.

71. Hardison,R. and Chalkley,R. (1978) *in* Methods in Cell Biology, (Stein,G., Stein,J. and Kleinsmith,L.J., eds), Academic Press, New York, Vol. 17, p. 235.

72. Thomas,J.O. and Kornberg,R.D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **72**, 2626.

73. Panyin,S. and Chalkley,R. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 7557.

74. Shmatchenko,V.V. and Varshavskey,A.J. (1978) Anal. Biochem. **85**, 42.

75. MacGillivray,A.J., Cameron,A., Krauze,R.T., Rickwood,D. and Paul,J. (1972) Biochim. Biophys. Acta **277**, 384.

76. Bickle,T.A. and Traut,R.R. (1974) *in* Methods in Enzymology (Moldave, K. and Grossman,L., eds), Academic Press, New York, Vol. 30, p. 545.

77. Kanda,F., Ochiai,H. and Iwabuchi,M. (1974) Eur. J. Biochem. **44**, 469.

78. Traub,P., Mizushima,S., Lowry,C.V. and Nomura,M. (1971) *in* Methods in Enzymology (Moldave,K. and Grossman,L., eds), Academic Press, New York and London, Vol. 20, p. 391.

79. Siu,C.H., Lerner,R.A. and Loomis,W.F. (1977) J. Mol. Biol. **116**, 469.

80. Hubbard,A.L. and Cohn,Z.A. (1972) J. Cell Biol. **55**, 390.

81. Gahmberg,C.G. (1977) *in* Dynamic Aspects of Cell Surface Organisation, Cell Surface Reviews (Poste,G. and Nicolson,G.L., eds), Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Vol. 3, p.371.

82. Dewald,B., Dulaney,J.T. and Touster,O. (1974) *in* Methods in Enzymology (Fleischer,S. and Packer,L., eds), Academic Press, New York, Vol. 32, p. 82.

83. Newby,A.C. and Chrambach,A. (1979) Biochem. J. **177**, 623.

84. Zahler,W.L. (1974) *in* Methods in Enzymology (Fleischer,S. and Packer,L., eds), Academic Press, New York, Vol. 32, p. 70.

85. Ballou,B. and Smithies,O. (1977) Anal. Biochem. **80**, 616.

86. Helenius,A. and Simons,K. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 529.

87. Bordier,C., Loomis,W.F., Elder,J. and Lerner,R. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 5133.

88. Margolis,J. and Kenrick,K.G. (1967) Nature (London) **214**, 1334.

89. Lambin,P.C. (1978) Anal. Biochem. **85**, 114.

90. Lambin,F. and Fine,J.M. (1979) Anal. Biochem. **98**, 160.

91. Poduslo,J.F. and Rodbard,D. (1980) Anal. Biochem. **101**, 394.

92. Anderson,L.O., Borg,H. and Mikaelson,M. (1972) FEBS Lett. **20**, 199.

93. Kopperschläger,G., Diezel,W., Bierwagen,B. and Hofman,E. (1969) FEBS Lett. **5**, 221.

94. Leaback,D.H. (1975) *in* Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. 2. Zone Electrophoresis (Smith,I., ed.), W.Heinemann Medical Books Ltd., London,p. 250.

95. Matsudaira,P.T. and Burgess,D.R. (1978) Anal. Biochem. **87**, 386.

96. Neuhoff,V. (1973) *in* Micromethods in Molecular Biology (Neuhoff,V., ed.), Springer Verlag, New York, p. 1.

97. Grossbach,U. (1974)*in* Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel (Allen,R.C. and Maurer,H.R., eds), Walter de Gruyter, Berlin and New York, p. 207.

98. Ruchel,R. (1974) *ibid.* p. 215.

99. Dames,W. and Maurer,H.R. (1974) *ibid.* p. 221.

100. Condeelis,J.S. (1977) Anal. Biochem. **77**, 195.

101. Maurer,H.R. and Dati,F.A. (1972) Anal. Biochem. **46**, 19.

102. Amos,W.B. (1976) Anal. Biochem. **70**, 612.

103. Dahlberg,A.E., Dingman,C.W. and Peacock,A.C. (1969) J. Mol. Biol. **41**, 139.

104. Dahlberg,A.E. (1979) *in* Methods in Enzymology (Moldave,K. and Grossman,L., eds), Academic Press, New York, Vol. 59, p. 397.

105. Kyte,J. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 4157.

106. Huston,L.L. (1971) Anal. Biochem. **44**, 81.

107. Bray,D. and Brownlee,S.M. (1973) Anal. Biochem. **55**, 213.

108. Raison,R.L. and Marchalonis,J.J. (1977) Biochemistry **16**, 2036.

109. Elder,J.H., Pickett,R.A., Hampton,J. and Lerner,R.A. (1977) J. Biol. Chem. **252**, 6510.

110. Cleveland,D.W., Fischer,S.G., Kirschner,M.C. and Laemmli,U.K. (1977) J. Biol. Chem. **252**, 1102.

111. Wiener,A.M., Platt,T. and Weber,K. (1972) J. Biol. Chem. **247**, 3242.

112. Bridgen,J. (1976) Biochemistry **15**, 3600.

113. Bridgen,J., Snary,D., Crumpton,M.J., Barnstaple,C., Goodfellow,P. and Bodmer,W. (1976) Nature (London) **261**, 200.

114. Laursen,R.A. and Machleidt,W. (1980) *in* Methods of Biochemical Analysis (Glick,D., ed.), J.Wiley and Sons, New York, Vol. 26, p. 201.

115. Ballou,B.T., McKean,D.J., Freedlender,E.F. and Smithies,O. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **73**, 4487.

116. Bhown,A.S., Mole,J.E., Hunter,F. and Bennett,J.C. (1980) Anal. Biochem. **103**, 184.

117. Weber,K. and Kuter,D.J. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 4505.

118. Manrow,R. and Dottin,R.P. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 730.

119. Hager,D.A. and Burgess,R.R. (1980) Anal. Biochem. **109**, 76.

120. Maurer,R.A., Stone,R. and Gorski,J. (1976) J. Biol. Chem. **251**, 2801.

121. Gorecki,M. and Zeelon,E.P. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 525.

122. Schutz,G., Beato,M. and Feigelson,P. (1974) *in* Methods in Enzymology (Moldave,K. and Grossman,L., eds), Academic Press, New York, Vol. 30, 701.

123. Kessler,S.W. (1975) J. Immunol. **115**, 1617.

124. Ivarie,R.D. and Jones,P.P. (1979) Anal. Biochem. **97**, 24.

125. Ma,G.C.L. and Firtel,R.A. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 3924.

126. Platt,T., Weber,K., Ganem,D. and Miller,J.H. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **69**, 897.

127. Banker,G.A. and Cotman,C.W. (1972) J. Biol. Chem. **247**, 5856.

128. Frank,R.N. and Rodbard,D. (1975) Arch. Biochem. Biophys. **171**, 1.

129. Dautrevaux,M., Boulanger,Y., Han,K. and Biserte,G. (1969) Eur. J. Biochem. **11**, 267.

第 二 章

1. Chrambach,A. and Rodbard,D. (1971) Science **172**, 440.

2. Chrambach,A., Jovin,T.M., Svendsen,P.J. and Rodbard,D. (1976) *in* Methods of Protein Separation (Catsimpoolas,N., ed.), Plenum Press, New York, Vol.2, p. 27.3

9. Nguyen,N.Y., Baumann,G., Arbegast,D., Grindeland,R. and Chrambach,A. (1981) Prep. Biochem., in press.[1]

10. Chen,B., Rodbard,D. and Chrambach,A. (1978) Anal. Biochem. **891, 596.**

11. Chrambach,A. (1966) Anal. Biochem. **15**, 544.

12. Nguyen,N.Y., DiFonzo,J. and Chrambach,A. (1980) Anal. Biochem. **106, 78.**

13. Chrambach,A. (1980) J. Mol. and Cell. Biochem. **29**, 23.

14. Kapadia,G. and Chrambach,A. (1972) Anal. Biochem. **48**, 90.

15. Chrambach,A. and Nguyen,N.Y. (1978) *in* Electrokinetic Separation Methods (Righetti,P.J., Van Oss,C.J. and Vanderhoff,J.W., eds), Elsevier, Amsterdam, p. 337.[1]

16. Houghten,R. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **77**, 303.

17. Kapadia,G., Vaitukaitis,J. and Chrambach,A. (1981) Prep. Biochem. **11**, No. 1.[1]

1. Chrambach,A., Jovin,T.M., Svendsen,P.J. and Rodbard,D. (1976) *in* Methods of Protein Separation (Catsimpoolas,N., ed.), Plenum Press, New York, Vol.2, p. 27.[1]

2. Nguyen,N.Y., McCormick,A.G. and Chrambach,A. (1978) Anal. Biochem. **88**, 186.

3. Jackiw,B.A. and Brown,R.K. (1980) Electrophoresis **1**, 107.

4. Jackiw,B.A., Chidakel,B.E., Chrambach,A. and Brown,R.K. (1980) Electrophoresis **1**, 102.

5. Chrambach,A., Hjelmeland,L., Nguyen,N.Y. and An der Lan,B. (1980) *in* Electrophoresis '79 (Radola,B.J., ed.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, p. 3.[1]

6. Chidakel,B.E., Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **77**, 216.

7. Baumann,G. and Chrambach,A. (1976) Anal. Biochem. **70**, 32.

8. Tipton,H., Rumen,N.M. and Chrambach,A. (1975) Anal. Biochem. **69**, 323.

9. Peterson,J.I., Tipton,H.W. and Chrambach,A. (1974) Anal. Biochem. **62**, 274.

10. Jackiw,A. (1979) XI International Congress Biochem. Montreal, Abstract p.716.

11. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1980) Electrophoresis **1**, 14.

12. McCormick,A., Miles,L.E.M. and Chrambach,A. (1976) Anal. Biochem. **75**, 314.

13. An der Lan,B. and Chrambach,A. (1980) Electrophoresis **1**, 23.

14. Vinogradov,S.N., Lowenkron,S., Andonian,M.R., Bagshaw,J., Felgenhauer, K. and Pak,S.J. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. **54**, 501.

15. Chrambach,A. and Nguyen,N.Y. (1977) *in* Electrofocusing and Isotachophoresis (Radola,B.J. and Graesslin,D., eds), Walter de Gruyter, Berlin-New York, p. 51.

16. Nguyen,N.Y., Rodbard,D., Svendsen,P.J. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **77**, 39.

17. Svensson,H. (1962) Acta Chem. Scand. **16**, 456.

18. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1976) Anal. Biochem. **74**, 145.

19. Nguyen,N.Y., Grindeland,R.E. and Chrambach,A. (1981) Prep. Biochem., **11**, 173.

20. Righetti,P.G. and Chrambach,A. (1978) Anal. Biochem. **90**, 633.

21. Hjelmeland,L.M., Allenmark,S., An der Lan,B., Jackiw,B.A., Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1981) Electrophoresis, in press.[1]

22. Hjelmeland,L.M., Nebert,D.W. and Chrambach,A. (1979) Anal. Biochem. **95**, 201.

23. Gianazza,E., Astorri,C. and Righetti,P.G. (1979) J. Chromatogr. **171**, 161.

24. Hjelmeland,L.M. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77**, 6368.

25. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **79**, 462.

26. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **82**, 54.

27. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **82**, 226.

28. Baumann,G. and Chrambach,A. (1975) *in* Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis (Righetti,P.G., ed.), Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Assoc. Sci. Publ., Amsterdam, p. 13.

29. Doerr,P. and Chrambach,A. (1971) Anal. Biochem. **42**, 96.

30. Salokangas,A., Eppenberger,U. and Chrambach,A. (1981) Prep. Biochem., in press.

31. Chrambach,A. (1980) Mol. and Cell. Biochem. **29**, 23.

32. Jackiw,B.A. and Chrambach,A. (1980) Electrophoresis **1**, 150.

33. Finlayson,G.R. and Chrambach,A. (1971) Anal. Biochem. **40**, 292.

34. Dirksen,M.L. and Chrambach,A. (1972) Sep. Sci. **7**, 747.[1]

35. Reisner,A.H., Nemes,P. and Bucholtz,C. (1975) Anal. Biochem. **64**, 509.

36. Diezel,W., Kopperschlaeger,G. and Hofmann,E. (1972) Anal. Biochem. **48**, 617.

37. Vesterberg,O., Hansen,L. and Sjosten,A. (1977) Biochim. Biophys. Acta **491**, 160

38. Righetti,P.G. and Gianazza,E. (1978) Biochim. Biophys. Acta **532**, 137.

39. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1979) J. Biochem. Biophys. Methods **1**, 971.

40. Nguyen,N.Y. Baumann,G., Arbegast,D., Grindeland,R.E. and Chrambach,A. (1981) Prep. Biochem., **11**, 139.

41. Baumann,G. and Chrambach,A. (1975) Anal. Biochem. **64**, 530.

42. Baumann,G. and Chrambach,A. (1975) Anal. Biochem. **69**, 649.

第 四 章

1. Garrels,J.I. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 7961.

2. Johns,E.W. (1976) *in* Subnuclear Components: Preparation and Fractionation (Birnie,G.D., ed.), Butterworths, London and Boston, p. 202.

3. Kruh,J., Schapira,G., Lareau,J. and Dreyfus,J.C. (1964) Biochim. Biophys.

Acta **87**, 669.

4. MacGillivray,A.J. (1976) *in* Subnuclear Components: Preparation and Fractionation (Birnie,G.D., ed.), Butterworths, London and Boston.
5. Higgins,R.C. and Dahmus,M.E. (1979) Anal. Biochem. **93**, 257.
6. Gordon,A.H. (1975) Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology; Work,T.S. and Work,E., eds), North-Holland, Amsterdam, Oxford, Vol. 1. p. 190.
7. Hunter,W.M. and Greenwood,F.C. (1962) Nature (London) **194**, 495.
8. Rice,R.H. and Means,G.E. (1971) J. Biol. Chem. **246**, 831.
9. Garrels,J.I. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 7961.
10. O'Farrell,P.H. (1975) J. Biol. Chem. **250**, 4007.
11. O'Farrell,P.H. (1977) Cell **12**, 1137.
12. Ames,G.F-L. and Nikaido,K. (1976) Biochemistry **15**, 616.
13. Kaltschmidt,E. and Wittmann,H.G. (1970) Anal. Biochem. **36**, 401.
14. Howard,G.A. and Traut,R.R. (1973) FEBS Lett. **29**, 177.
15. Hoffmann,P. and Chalkley,R. (1976) Anal. Biochem. **76**, 539.
16. Reisfeld,R.A. Lewis,U.J. and Williams,D.E. (1962) Nature (London) **195**, 281.
17. Thomas,J. and Kornberg,R. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **72**, 2626.
18. Orrick,L., Olson,M. and Busch,H. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **70**, 1316.
19. Sinclair,J.H. and Rickwood,D. (1980) Paper in preparation.
20. Anderson,N.G. and Anderson,N.L. (1978) Anal. Biochem. **85**, 341.
21. Dean,B. (1979) Anal. Biochem. **99**, 105.
22. Mets,L.J. and Borograd,L. (1974) Anal. Biochem. **57**, 200.
23. Martini,O.H.W. (1974) Ph.D.thesis (University of London).
24. Hoffman,W.L. and Dowben,R.M. (1978) Anal. Biochem. **89**, 540.
25. Jones,M.I., Massingham,W.E. and Spragg,S.P. (1980) Anal. Biochem. **106**, 446.
26. Ballal,N.R., Kang,Y.J., Olson,M.O.J. and Busch,H. (1975) J. Biol. Chem. **250**, 5921.

第　五　章

1. James,G.T. (1980) *in* Methods of Biochemical Analysis (Glick,D., ed.), J.Wiley, New York, Vol. 26, p. 165.
2. Bray,D. and Brownlee,S.M. (1973) Anal. Biochem. **55**, 213.
3. Raison,R.L. and Marchalonis,J.J. (1977) Biochemistry **16**, 2036.
4. Elder,J.H., Pickett,R.A., Hampton,J. and Lerner,R.A. (1977) J. Biol. Chem. **252**, 6510.
5. Cleveland,D.W., Fischer,S.G., Kirschner,M.W. and Laemmli,U.K. (1977) J. Biol. Chem. **252**, 1102.

6. Greenwood,F.C., Hunter,W.M. and Glover,J.S. (1963) Biochem. J. **89**, **114**.

7. Christopher,A.R., Nagpal,M.L., Carroll,A.R. and Brown,J.C. (1978) Anal. Biochem. **85**, 404.

8. Tijssen,P. and Kurstak,E. (1979) Anal. Biochem. **99**, 97.

9. Bordier,C. and Crettol-Järvinen,A. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 2565.

10. Calvert,R. and Gratzer,W.B. (1978) FEBS Lett. **86**, 247.

第 六 章

1. Roitt,I.M. (1977) see general references.

2. Weir,D.M. (ed.) (1978) see general references.

3. Stevenson,G.T. (1974) Nature (London) **247**, 477.

4. Ouchterlony,O. (1949) Acta Pathol. Microbiol. Scand. **26**, 507.

5. Hudson,L. and Hay,F.C. (1976) see general references.

6. Uriel,J. (1964) *in* Immunoelectrophoretic Analysis (Grabar,P. and Burtin,P., eds), Elsevier,I.E.P., Amsterdam, p. 58.

7. Jurd,R.D., Luther-Davies,S.M. and Stevenson,G.T. (1975) Comp. Biochem. Physiol. **50B**, 65.

8. Hunter,W.M. and Greenwood,F.C. (1962) Nature (London) **194**, 495.

9. Scazzocchio,C., Holl,F.B. and Foguelman,A.I. (1973) Eur. J. Biochem. **36**, 428.

10. Axelsen,N.H., Krøll,J. and Weeks,B. (eds) (1973) see general references.

第 七 章

1. Shaw, C.R. and Prasad, R. (1970) Biochem. Genet. **4**, 297.

2. Siciliano, M.J. and Shaw, C.R. (1976) *in* Chromatographic and Electrophoretic Techniques (Smith, I., ed.), William Heinemann Medical Books Ltd., London, Vol. 2, p. 185.

3(a). Harris, H. and Hopkinson, D.A. (1976) Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics, North-Holland, Amsterdam.
(b). Supplement (1977).
(c). Supplement (1978).

4. Gabriel, O. (1971) *in* Methods in Enzymology (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds), Academic Press, New York, Vol. 22, p. 578.

5. Cullis, C.A. and Kolodynska, K. (1975) Biochem. Genet. **13**, 687.

6. Slaughter, C.A., Hopkinson, D.A. and Harris, H. (1975) Ann. Hum. Genet. **39**, 193.

7. Mowbray, S., Watson, B. and Harris, H. (1972) Ann. Hum. Genet. **36**, 153.

8. Tischfield, J.A., Bernhard, H.P. and Ruddle, F.H. (1973) Anal. Biochem. **53**, 545.

9. Spencer, N., Hopkinson, D.A. and Harris, H. (1968) Ann. Hum. Genet. **32**, 9.

10. Klobutcher, L.A., Nichols, E.A., Kucherlapati, R.S. and Ruddle, F.H. (1976) *in* Birth Defects; Original Article Series, The National Foundation, March of Dimes, New York, Vol. 12, 171.

3. Chrambach,A. (1978) *in* Electrokinetic Separation Methods (Righetti,P.J., van Oss,C.J. and Vanderhoff,J.W., eds), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 275.

4. Ornstein,L. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. **121**, 321.

5. Chrambach,A. and Rodbard,D. (1972) Sep. Sci. **7**, 663.[3]

6. Newby,A.C., Matthews,G. and Chrambach,A. (1978) Anal. Biochem. **91**, 473.

7. Chrambach,A. (1980) J. Mol. Cell. Biochem. **29**, 23.

8. Muniz,N., Rodbard,D. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **83**, 724.

9. Rodbard,D., Levitov,C. and Chrambach,A. (1972) Sep. Sci. **7**, 705.[3]

10. Baumann,G. and Chrambach,A. (1976) Anal. Biochem. **70**, 32.

11. Wyckoff,M., Rodbard,D. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **78**, 459.

12. Chen,B., Griffith,A., Catsimpoolas,N., Chrambach,A. and Rodbard,D. (1978) Anal. Biochem. **89**, 609.

13. Jovin,T.M. (1973) Biochemistry **12**, 871,879,890.

14. Everaerts,F.M., Beckers,J.L. and Verheggen,T.P.E.M. (1976) Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Applications, Elsevier, Amsterdam.

15. Svendsen,P.J. and Schaefer-Nielsen,C. (1979) *in* Electrophoresis '79 (Radola,B.J., ed.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, p. 265.

16. Bui,C., Galea,V. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **81**, 108.

17. Jovin,T.M. (1973) Ann. N.Y. Acad. Sci. **209**, 477.

18. Chidakel,B.E., Ellwein,L.E. and Chrambach,A. (1978) Anal. Biochem. **85**, 316.

19. Kapadia,G. and Chrambach,A. (1972) Anal. Biochem. **48**, 90.

20. Diezel,W., Kopperschläger,G. and Hofmann,E. (1972) Anal. Biochem. **48**, 617.

21. Baumann,G. and Chrambach,A. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA **73**, 732.

22. Ben-Or,S. and Chrambach,A. (1981) Arch. Biochem. Biophys. **206**, 308.

23. Dirksen,M.L. and Chrambach,A. (1972) Sep. Sci. **7**, 747.[3]

24. Hjelmeland,L.M. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77**, 6368.

25. Newby,A.C. and Chrambach,A. (1978) Biochem. J. **177**, 623.

26. Rodbard,D. and Chrambach,A. (1974) *in* Electrophoresis and Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gel (Allen,R.C. and Maurer,H.R., eds), Walter de Gruyter, Berlin, p. 28.[3]

27. Rodbard,D. and Chrambach,A. (1971) Anal. Biochem. **40**, 95.

28. Lang,U., Kahn,C.R. and Chrambach,A. (1980) Endocrinology **106**, 40.

29. Chidakel,B.E., Baumann,G., Rodbard,D. and Chrambach,A. (1975) Anal. Biochem. **66**, 540.

30. Chrambach,A., Reisfeld,R.A., Wyckoff,M. and Zaccari,J. (1967) Anal. Biochem. **20**, 150.

31. a)Tipton,H., Rumen,N.M. and Chrambach,A. (1975) Anal. Biochem. 69, 323.
b) Peterson,J.I., Tipton,H.W. and Chrambach,A. (1974) Anal. Biochem. **62**. 274.

32. Kohler,P.O., Bridson,W.E. and Chrambach,A. (1971) J. Clin. Endocrinol. **32**, 70.

33. Magnusson,R.P. and Jackiw,A. (1979) J. Biochem. Biophys. Methods **1**, 65.

34. Rodbard,D. (1976) *in* Methods of Protein Separation (Catsimpoolas,N., ed.), Plenum Press, New York, Vol.2, p. 145.[3]

35. Muniz,N., Rodbard,D. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **83**, 724.

36. Hedrick,J.L. and Smith,A.J. (1968) Arch. Biochem. Biophys. **126**, 154.

37. Rodbard,D. and Chrambach,A. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA **65**, 970.

38. Rogol,A.D., Ben-David,M., Sheats,R., Rodbard,D. and Chrambach,A. (1975) Endocr. Res. Comm. **2**, 379.[3]

39. Rodbard,D., Chrambach,A. and Weiss,G.H. (1974) *in* Electrophoresis and Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gel (Allen,R.C. and Maurer,H.R., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, p. 62.[3]

40. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1979) J. Biochem. Biophys. Methods **1**, 171.

41. Chrambach,A. and Nguyen,N.Y. (1978) *in* Electrokinetic Separation Methods (Righetti,P.J., van Oss,C.J. and Vanderhoff,J.W., eds), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 337.[3]

42. Chen,B., Griffith,A., Catsimpoolas,N., Chrambach,A. and Rodbard,D. (1978) Anal. Biochem. **89**, 609.

43. Chen,B., Chrambach,A. and Rodbard,D. (1979) Anal. Biochem. **97**, 120.

44. Rodbard,D., Kapadia,G. and Chrambach,A. (1971) Anal. Biochem. **40**, 135.

45. Kapadia,G., Chrambach,A. and Rodbard,D. (1974) *in* Electrophoresis and Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gel (Allen,R.C. and Maurer,H.R., eds), Walter de Gruyter, Berlin, p. 115.[3]

46. Nguyen,N.Y., DiFonzo,J. and Chrambach,A. (1980) Anal. Biochem. **106**, 78.

47. Jovin,T. Chrambach,A. and Naughton,M.A. (1969) Anal. Biochem. **9**, 351.

48. Ehwein,L.B., Huff,R.W. and Chrambach,A. (1977) Anal. Biochem. **82**, 46.

49. Wachslicht,H. and Chrambach,A. (1978) Anal. Biochem. **84**, 533.

第　三　章

1. Everaerts,F.M., Beckers,J.L. and Verheggen,T.P.E.M. (1976) Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Applications, Elsevier, Amsterdam.

2. Ornstein,L. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. **121**, 321.

3. Jovin,T.M. (1973) Biochemistry **12**, 871, 879, 890.

4. Baumann,G. and Chrambach,A. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **73**, 732.

5. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1978) Anal. Biochem. **94**, 202.

6. Nguyen,N.Y. and Chrambach,A. (1980) Electrophoresis **1**, 14.

7. Baumann,G. and Chrambach,A. (1976) Anal. Biochem. **70**, 32.

8. Chrambach,A., Hjelmeland,L., Nguyen,N.Y. and An der Lan,B. (1980) *in* Electrophoresis '79 (Radola, B.J., ed.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, p.3.[1]

11. Wilson, D.E., Povey, S. and Harris, H. (1976) Ann. Hum. Genet. **39**, 305.

12. Frederick, J.F. (1968) Ann. N.Y. Acad. Sci. **151**, 413.

13. Chen, S.H., Giblett, E.R., Anderson, J.E. and Fossum, B.L.G. (1972) Ann. Hum. Genet. **35**, 401.

14. Sofer, W. and Ursprung, H. (1968) J. Biol. Chem. **243**, 3110.

15. Smith, M., Hopkinson, D.A. and Harris, H. (1971) Ann. Hum. Genet. **34**, 251.

16. Lewinski, N.D. and Dekker, E.E. (1978) Anal. Biochem. **87**, 56.

17. Sussman, H.H., Small, P.A. and Cotlove, E. (1968) J. Biol. Chem. **243**, 160.

18. Ma Lin, A.W. and Castell, D.O. (1975) Anal. Biochem. **69**, 637.

19. Barker, R.F. and Hopkinson, D.A. (1977) Ann. Hum. Genet. **41**, 27.

20. Hayes, M.B. and Wellner, D. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 6636.

21. Nelson, R.L., Povey, S., Hopkinson, D.A. and Harris, H. (1977) Biochem. Genet. **15**, 1023.

22. Anderson, J.E., Teng, Y.S. and Liblett, E.R. (1975) *in* Birth Defects; Original Article Series, The National Foundation, March of Dimes, New York, Vol. 11, p. 295.

23. Heller, H. and Kulka, R.G. (1968) Biochim. Biophys. Acta **165**, 393.

24. Boettcher, D. and De La Lande, F.A. (1969) Anal. Biochem. **28**, 510.

25. Grove, T.H. and Levy, H.R. (1975) Anal. Biochem. **65**, 458.

26. Farron, F. (1973) Anal. Biochem. **53**, 264.

27. Landon, M. (1977) Anal. Biochem. **77**, 293.

28. Shapira, E., De Gregorio, R.R., Matalon, R. and Nadler, H.R. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. **62**, 448.

29. Chang, P.L., Ballantyne, S.R. and Davidson, R.G. (1979) Anal. Biochem. **97**, 36.

30. Davidson, R.G., Cortner, J.A., Rattazi, M.C., Ruddle, F.H. and Lubs, H.A. (1970) Science **169**, 391.

31. Hopkinson, D.A., Coppock, J.S., Mühlemann, M.F. and Edwards, Y.H. (1974) Ann. Hum. Genet. **38**, 155.

32. Drescher, D.G. (1978) Anal. Biochem. **90**, 349.

33. Erickson, K.E. and Petterson, B. (1973) Anal. Biochem. **56**, 618.

34. Harris, H., Hopkinson, D.A. and Robson, E.B. (1962) Nature (London) **196**, 1296.

35. Gertler, A., Trencer, Y. and Tinman, G. (1973) Anal. Biochem. **54**, 270.

36. Craig, I. (1973) Biochem. Genet. **9**, 351.

37. Yue, R.H., Jacobs, H. K., Okabe, K., Keutel, H.J. and Kuby, S.A. (1968) Biochemistry **7**, 4291.

38. Monn, E. and Christiansen, R.O. (1971) Science **173**, 540.

39. Teng, Y.S., Anderson, J.E. and Giblett, E.R. (1975) Am. J. Hum. Genet. **27**, 492.

40. Williams, L. and Hopkinson, D.A. (1975) Hum. Hered. **25**, 567.

41. Kaplan, J.C. and Beutler, E. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. **29**, 605.

42. Suguira, M., Ito, Y., Hirano, K. and Sawaki, S. (1977) Anal. Biochem. **81**, 481.

43. Hallock, R.O. and Yamada, E.W. (1973) Anal. Biochem. **56**, 84.

44. Jovin, T.M., Englund, P.T. and Bertsch, L.L. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 2996.

45. Dijkhof, J. and Poort, C. (1977) Anal. Biochem. **83**, 315.

46. Sharma, H.K. and Rothstein, M. (1979) Anal. Biochem. **98**, 226.

47. Coates, P.M., Mestriner, M.A. and Hopkinson, D.A. (1975) Ann. Hum. Genet. **39**, 1.

48. Russell, R.R.B. (1979) Anal. Biochem. **97**, 173.

49. Schachter, H., Sarney, J., McGuire, E.J. and Roseman, S. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 4785.

50. Turner, B.M., Beratis, N.G., Turner, V.S. and Hirschhorn, K. (1974) Clin. Chim. Acta **57**, 29.

51. Edwards, Y.H. and Hopkinson, D.A. (1978) Ann. Hum. Genet. **42**, 303.

52. Nicholls, E.A., Elsevier, S.M. and Ruddle, F.H. (1974) Cytogenet. Cell Genet. **13**, 275.

53. Ng, W.G., Bergren, W.R., Fields, M. and Donnell, G.N. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. **37**, 354.

54. Beutler, E. and Kuhl, W. (1972) J. Biol. Chem. **247**, 7195.

55. Beutler, E., Guinto, E. and Kuhl, W. (1973) Am. J. Hum. Genet. **25**, 42.

56. Norden, A.G.W. and O'Brien, J.S. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **72**, 240.

57. Alpers, D.H. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 1238.

58. Alpers, D.H., Steers, E., Shifrin, S. and Tomkins, G. (1968) Ann. N.Y. Acad. Sci. **151**, 545.

59. Pierce, M., Cummings, R.D. and Roth, S. (1980) Anal. Biochem. **102**, 441.

60. Criss, W.E. and McKerns, K.W. (1968) Biochemistry **7**, 125.

61. Swallow, D.M., Corney, G., Harris, H. and Hirschhorn, R. (1975) Ann. Hum. Genet. **38**, 391.

62. Beutler, E., Kuhl, W., Trinidad, F., Teplitz, R. and Nadler, H. (1971) Am. J. Hum. Genet. **23**, 62.

63. Fondo, E.Y. and Bartalos, M. (1969) Biochem. Genet. **3**, 591.

64. Franke, U. (1976) Am. J. Hum. Genet. **28**, 357.

65. Nelson, R.L., Povey, M.S., Hopkinson, D.A. and Harris, H. (1977) Biochem. Genet. **15**, 87.

66. Davis, J.N. and Prusiner, S. (1973) Anal. Biochem. **54**, 272.
67. Beutler, E. and West, C. (1974) Am. J. Hum. Genet. **26**, 255.
68. Kaplan, J.C. and Beutler, E. (1968) Nature (London) **217**, 256.
69. Board, P.G. (1980) Anal. Biochem. **105**, 147.
70. Charlesworth, D. (1972) Ann. Hum. Genet. **35**, 477.
71. Duley, J. and Holmes, R.S. (1974) Genetics **76**, 93.
72. Price, R.G. and Dance, N. (1967) Biochem. J. **105**, 877.
73. Gabriel, O. and Wang, S.F. (1969) Anal. Biochem. **27**, 545.
74. Kompf, J., Bissbort, S., Gussman, S. and Ritter, H. (1975) Humangenetik **27**, 141.
75. Parr, C.W., Bagster, I.A. and Welch, S.G. (1977) Biochem. Genet. **15**, 109.
76. Jamil, T., Fisher, R.A. and Harris, H. (1976) Hum. Hered. **25**, 402.
77. Katzen, H.M. and Schimke, R.T. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **54**, 1218.
78. Rogers, P.A., Fisher, R.A. and Harris, H. (1975) Biochem. Genet. **13**, 857.
79. Ogilvie, J.W., Sightler, J.H. and Clark, R.B. (1969) Biochemistry **8**, 3557.
80. Craig, I., Tolley, E. and Borrow, M. (1976) *in* Birth Defects; Original Article Series, The National Foundation, March of Dimes, New York, Vol. **12**, 114.
81. Vasquez, B. and Bieber, A.L. (1978) Anal. Biochem. **84**, 504.
82. Fischer, R.A., Turner, B.M., Dorkin, H.L. and Harris, H. (1974) Ann. Hum. Genet. **37**, 341.
83. Babczinski, P. (1980) Anal. Biochem. **105**, 328.
84. Henderson, N.S. (1968) Ann. N.Y. Acad. Sci. **151**, 429.
85. Turner, B.M., Fisher, R.A. and Harris, H. (1974) Ann. Hum. Genet. **37**, 455.
86. Reeves, H.C. and Volk, M.J. (1972) Anal. Biochem. **48**, 437.
87. Allen, J.M. (1961) Ann. N.Y. Acad. Sci. **94**, 937.
88. Werthamer, S., Freiberg, A. and Amaral, L. (1973) Clin. Chim. Acta **45**, 5.
89. Strongin, A.Y., Azarenkova, N.M., Vaganova, T.I., Levin, A.D. and Stepanov, V.M. (1976) Anal. Biochem. **74**, 597.
90. Nachlase, M.M., Morris, B., Rosenblatt, D. and Seligman, A.M. (1960) J. Biophys. Biochem. Cytol. **7**, 261.
91. Millard, S.A., Kubose, A. and Gal, E.M. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 2511.
92. Allen, S.L. (1968) Ann. N.Y. Acad. Sci. **151**, 190.
93. Volk, M.J., Trelease, R.N. and Reeves, H.C. (1974) Anal. Biochem. **58**, 315.
94. Cohen, P.T.W. and Omenn, G.S. (1972) Biochem. Genet. **7**, 303.
95. Povey, S., Wilson, D.E., Harris, H., Gormley, I.P., Perry, P. and Buckton, K.E. (1975) Ann. Hum. Genet. **39**, 203.

96. Nichols, E.A., Chapman, V.M. and Ruddle, F.H. (1973) Biochem. Genet. 8, 47.
97. Poenaru, L. and Dreyfus, J.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 303, 171.
98. Okada, S., Veath, M.L., Lerov, J. and O'Brien, J.S. (1971) Am. J. Hum. Genet. 23, 55.
99. Flechner, L., Hirschhorn, S. and Bekierkunst, A. (1968) Life Sci. 7, 1327.
100. Ravazzolo, R., Bruzzone, G., Garrè, C. and Ajmar, F. (1976) Biochem. Genet. 14, 877.
101. Ingle, J. (1968) Biochem. J. 108, 715.
102. Hucklesby, D.P. and Hageman, R.H. (1973) Anal. Biochem. 56, 591.
103. Lacks, S.A., Springhorn, S.S. and Rosenthal, A.L. (1979) Anal. Biochem. 100, 357.
104. Rosenthal, A.L. and Lacks, S.A. (1977) Anal. Biochem. 80, 76.
105. Spencer, N., Hopkinson, D.A. and Harris, H. (1968) Ann. Hum. Genet. 32, 9.
106. Edwards, Y.H., Hopkinson, D.A. and Harris, H. (1971) Ann. Hum. Genet. 34, 395.
107. Dvorak, H.F. and Heppel, L.A. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2647.
108. Baron, D.N. and Buttery, J.E. (1972) J. Clin. Pathol. 25, 415.
109. Feinstein, R.N. and Lindahl, R. (1973) Anal. Biochem. 56, 353.
110. Scrutton, M.C. and Fatebene, F. (1975) Anal. Biochem. 69, 247.
111. Lewis, W.H.P. and Harris, H. (1967) Nature (London) 215, 315.
112. Rapley, S., Lewis, W.H.P. and Harris, H. (1971) Ann. Hum. Genet. 34, 307.
113. Brock, D.J.H. (1969) Biochem. J. 113, 235.
114. Niessner, N. and Beutler, E. (1974) Biochem. Med. 9, 73.
115. De Lorenzo, R.J. and Ruddle, F.H. (1969) Biochem. Genet. 3, 151.
116. Kühn, P., Schmidtmann, U. and Spielmann, W. (1977) Hum. Genet. 35, 219.
117. Fildes, R.A. and Parr, C.W. (1963) Nature (London) 200, 890.
118. Beutler, E. (1969) Biochem. Genet. 3, 189.
119. Omenn, G.S. and Cheung, S.C.Y. (1974) Am. J. Hum. Genet. 26, 393.
120. Chen, S.H., Anderson, J., Giblett, E.R. and Lewis, M. (1974) Am. J. Hum. Genet. 26, 73.
121. Barker, R.F. and Hopkinson, D.A. (1978) Ann. Hum. Genet. 42, 1.
122. Shier, W.T. and Troffer, J.T. (1978) Anal. Biochem. 87, 604.
123. Heussen, E. and Dowdle, E.B. (1980) Anal. Biochem. 102, 196.
124. Klee, C.B. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2558.
125. Andary, T.J. and Dabich, D. (1974) Anal. Biochem. 57, 457.
126. North, M.J. and Harwood, J.M. (1979) Biochim. Biophys. Acta 566, 222.

127. Filho, J.X. and De Azevedo Moreira, R. (1978) Anal. Biochem. **84**, 296.

128. Hirsch, A. and Rosen, M. (1974) Anal. Biochem. **60**, 389.

129. Gagelman, M., Pyerin, W., Kübler, D. and Kinzel, V. (1979) Anal. Biochem. **93**, 52.

130. Chern, C.J. and Beutler, E. (1976) Ann. Hum. Genet. **28**, 9.

131. Imamura, K. and Tanaka, T. (1972) J. Biochem. **71**, 1043.

132. Biswas, S. and Hollander, V.P. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 4185.

133. Lyublinskaya, L.A., Belyaev, S.V., Strongin, A. Ya, Matyash, L.F. and Stepanov, V.M. (1974) Anal. Biochem. **62**, 371.

134. Cohen, H.J. (1973) Anal. Biochem. **53**, 208.

135. Beauchamp, C. and Fridovitch, I. (1971) Anal. Biochem. **44**, 276.

136. Beckman, G., Lundgren, A., Tarnvik, A. (1973) Hum. Hered. **23**, 338.

137. Hatfield, G.W. and Umbarger, H.E. (1970) J. Biol. Chem. **245**, 1736.

138. Killick, K.A. and Wang, L.W. (1980) Anal. Biochem. **106**, 367.

139. Kaplan, J.C., Teeple, L., Shore, N. and Beutler, E. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. **31**, 768.

140. Scopes, R.K. (1964) Nature (London) **201**, 924.

141. Suguira, M., Ho, Y., Hirano, K. and Sawaki, S. (1977) Anal. Biochem. **81**, 481.

142. Gertler, A., Tencer, Y. and Tinman, G. (1973) Anal. Biochem. **54**, 270.

143. Walker, D.G. and Khan, H.H. (1968) Biochem. J. **108**, 169.

144. Manrow, R.F. and Dottin, R.P. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 730.

145. Giblett, E.R., Anderson, J.A., Chen, S.H., Teng, Y.S. and Cohen, F. (1974) Am. J. Hum. Genet. **26**, 627.

146. Shaik-M, M.B., Guy, A.L., Pancholy, S.K. (1980) Anal. Biochem. **103**, 140.

中科院植物所图书馆
S0014803

收到期 1987.1.9
来 源 西单新
书 价 3.35元
单据号 0160398
开票日期 1987.1.9

1.

243340　58.17421 406

蛋白质的凝胶电泳实践方法

借者	还期	借者	还期
李韶山	91.6.10	[illegible]	93.7.7
刘[illegible]	92.2.20	[illegible]	[illegible]
[illegible]	91.3.21	[illegible]	02.8.12

分类	编号
登记号	

58.17421
406

243340

读者注意

1. 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写，损坏或遗失照章赔偿。
2. 请在借书期限前送还以便他人阅读请赐予合作。

成1106-1